



TUGAS AKHIR - SB141510

RESISTENSI DAN POTENSI *Azotobacter* SEBAGAI *BIOREMOVAL* TIMBAL (Pb)

LILIS WAHYU ASTUTIK
1511100033

Dosen Pembimbing
Dr. Enny Zulaika, M.P.

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA 2015



TUGAS AKHIR - SB141510

RESISTENSI DAN POTENSI *Azotobacter* SEBAGAI BIOREMOVAL TIMBAL (Pb)

LILIS WAHYU ASTUTIK
1511100033

Dosen Pembimbing
Dr. Enny Zulaika, M.P.

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA 2015



FINAL PROJECT - SB141510

RESISTENSI DAN POTENSI *Azotobacter* SEBAGAI BIOREMOVAL TIMBAL (Pb)

LILIS WAHYU ASTUTIK
1511100033

Supervisor
Dr. Enny Zulaika, M.P.

BIOLOGY DEPARTMENT
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA 2015

LEMBAR PENGESAHAN
RESISTENSI DAN POTENSI *Azotobacter* SEBAGAI
***BIOREMOVAL* TIMBAL (Pb)**

TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Sarjana Sains
pada
Jurusan S-1 Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh:

LILIS WAHYU ASTUTIK
NRP. 1511 100 033

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir

Dr. Enny Zulaika, M.P. (Pembimbing)

Surabaya, 29 Juli 2015

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi



Ditandatangani, Ir. Maya Shovitri, M.Si
NIP. 19690907 199803 2 001

RESISTENSI DAN POTENSI *Azotobacter* SEBAGAI BIOREMOVAL TIMBAL (Pb)

Nama Mahasiswa : Lilis Wahyu Astutik
NRP : 1511 100 033
Jurusan : Biologi
Dosen Pembimbing : Dr. Enny Zulaika, M.P.

Abstrak

Timbal (Pb) merupakan logam berat yang dapat ditemukan di alam dan bersifat toksik terhadap lingkungan. Beberapa genera bakteri memiliki sifat resisten terhadap logam timbal. Azotobacter spp. yang diisolasi dari lahan Eco Urban Farming ITS dilaporkan memiliki resistensi terhadap HgCl_2 sampai 5 mg/L. Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan isolat Azotobacter yang resisten terhadap logam timbal, serta mengetahui kemampuan bioremoval Azotobacter terhadap logam timbal yang dipaparkan.

Isolat yang digunakan adalah Azotobacter spp. dengan kode isolat A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, dan A10. Uji resistensi digunakan untuk seleksi isolat yang resisten terhadap PbCl_2 , dan range finding test digunakan untuk mendapatkan konsentrasi saat uji bioremoval. Pola pertumbuhan isolat uji dapat diketahui dengan kurva pertumbuhan Azotobacter spp. Uji bioremoval dilakukan pada (μ) jam usia bakteri dengan menggunakan medium NB- PbCl_2 sesuai konsentrasi pada range finding test yaitu 50, 100 dan 150 mg/L. Pengukuran konsentrasi PbCl_2 menggunakan Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) dengan λ 283.3 nm.

Hasil uji resistensi terhadap PbCl_2 , sembilan isolat yang resisten pada media Nutrient Agar yang mengandung PbCl_2 sampai dengan 300 mg/L, isolat tersebut adalah A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A8, A9 dan A10. Isolat Azotobacter yang memiliki kemampuan tertinggi dalam bioremoval Pb^{2+} adalah isolat A1a

sebesar 8,825 mg/L dengan pemaparan 77,91 mg/L dan efisiensi bioremovlnya sebesar 11,33%.

Kata kunci: Azotobacter spp., Bioremoval, Timbal.

RESISTANCE AND BIOREMOVAL OF LEAD (Pb) BY *Azotobacterial*

Student Name : Lilis Wahyu Astutik
NRP : 1511 100 033
Department : Biologi
Supervisor : Dr. Enny Zulaika, M.P.

Abstract

Lead (Pb) is one of heavy metals that can found in nature. Lead is toxic for animals and human. Some genera of bacteria was known has lead's persistant ability, such as *Azotobacter*. *Azotobacter* spp. Has been isolated from ITS Eco Urban Farming was reported have HgCl₂ resistant ability until 5 mg/L. The purposes of this reserch are to get *Azotobacter* isolate who persistant by lead and to known bioremoval ability of *Azotobacter* from lead exposure.

Isolates of *Azotobacter* in this research was codeed by A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, dan A10. Resistant test was used to select the isolate which resistant by PbCl₂. Range finding test was used to find the concentration of PbCl₂ at bioremoval test. Growth pettern of the isolates can be known by doing *Azotobacter* growth curve measurment. Bioremoval test has doing at (μ) hour of isolate growth with NB-PbCl₂ was using Atomic Absorbtion Spectrophotometer (AAS) at 283.3 nm.

The result of PbCl₂ resistant test there are nine isolates resistant in nutrient agar medium until 300 mg/L concentrate, they are A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A8, A9 and A10. *Azotobacter* isolate which batter bioremoval ability is A1a 8,825 mg/L lead exposure in 77,91 mg/L and the efisien for bioremoval ability is 11.33%.

Keywords: *Azotobacter* spp., Bioremoval, Lead.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala limpahan rahmat, inayah, taufiq dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan pembuatan Tugas Akhir yang berjudul **RESISTENSI DAN POTENSI *Azotobacter* SEBAGAI BIOREMOVAL TIMBAL (Pb)**. Penyusunan Tugas Akhir ini merupakan suatu syarat untuk Kelulusan di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

Dalam penyusunan Tugas Akhir ini tidak lepas dari bimbingan dan bantuan berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih kepada, Ibu Dr. Enny Zulaika, M.P selaku dosen pembimbing, Ibu Nurhidayatul Alami S.Si., M.Si dan Ibu Kristanti Indah Purwani S.Si., M.Si selaku Penguji 1 dan penguji 2. Penulis juga mengucapkan terima kasih atas doa dan dukungan dari orang tua, B14 *Scylla serrata*, teman-teman yang tergabung dalam Grup Riset Bioremediasi dan Biofertilizer dan seluruh pihak yang telah membantu.

Penulis menyadari Tugas Akhir ini masih banyak kekurangan, namun besar harapan laporan Tugas Akhir ini dapat bermanfaat.

Surabaya, 28 Juni 2015

Lilis Wahyu A.

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	iii
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vii
KATA PENGANTAR.....	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvii

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Permasalahan	2
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan	3
1.5 Manfaat	3

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Timbal (Pb)	5
2.2 Toksisitas Timbal	6
2.3 Kurva Pertumbuhan Bakteri	7
2.4 Bakteri Resisten Pb	9
2.5 <i>Bioremoval</i>	10
2.6 Genus <i>Azotobacter</i>	11

BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	13
3.2 Metode yang Digunakan	13
3.2.1 Persiapan subkultur dan uji rekonfirmasi isolat <i>Azotobacter</i>	13
3.2.2 Uji resistensi dan <i>range finding test</i> <i>Azotobacter</i> terhadap logam PbCl ₂	15

3.2.3 Uji viabilitas <i>Azotobacter</i> pada medium NB-PbCl ₂	15
3.2.4 Penentuan umur perlakuan <i>bioremoval</i> isolat <i>Azotobacter</i> terhadap PbCl ₂	16
3.2.5 Uji Bioremoval Logam PbCl ₂	17
3.2.6 Viabilitas <i>Azotobacter</i> pada Cekaman PbCl ₂	18
3.3 Rancangan penelitian	19
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	 21
4.1 Rekonfirmasi Genus <i>Azotobacter</i> spp.	22
4.2 Resistensi dan <i>Range Finding Test</i> Terhadap PbCl ₂	27
4.3 Viabilitas Isolat <i>Azotobacter</i> A1a, A5 dan A9 yang Tercekam Logam PbCl ₂	31
4.4 Penentuan Umur Perlakuan <i>Bioremoval</i> Isolat <i>Azotobacter</i> A1a, A5 dan A9 terhadap Logam PbCl ₂	32
4.5 <i>Bioremoval</i> PbCl ₂	37
4.6 Viabilitas <i>Azotobacter</i>	
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	 39
5.1 Kesimpulan	39
5.2 Saran	39
 DAFTAR PUSTAKA	 41
 LAMPIRAN	 49

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 <i>Profile Matching</i> Isolat Uji dengan Karakter Kunci <i>Azotobacter</i> (Holt <i>et al.</i> , 1994).....	21
Tabel 4.2 Resistensi Isolat <i>Azotobacter</i> terhadap PbCl ₂	23
Tabel 4.3 Konsentrasi PbCl ₂ pada Medium Kontrol	33
Tabel 4.4 <i>Bioremoval</i> dan Efisiensi <i>Bioremoval</i> PbCl ₂	34
Tabel 4.5 Viabilitas <i>Azotobacter</i> Uji setelah Terpapar PbCl ₂	37

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	Kurva Pertumbuhan Bakteri, Menunjukkan Empat Fase Pertumbuhan	7
Gambar 2.2	Mekanisme Transpot Pb di Dalam Sel Bakteri.....	9
Gambar 2.3	Bentuk Sel <i>Azotobacter Vinelandii</i>	11
Gambar 2.4	Bentuk <i>Cyst Azotobacter</i>	12
Gambar 4.1	Gambar Uji Resistensi Isolat pada Medium NA-PbCl ₂	25
Gambar 4.2	Kurva Pertumbuhan <i>Azotobacter</i> A1a pada Medium NB-Pbcl ₂ Dengan Konsentrasi 50,100, Dan 150 Mg/L	28
Gambar 4.3	Kurva Pertumbuhan <i>Azotobacter</i> A5 Pada Medium NB-Pbcl ₂ Dengan Konsentrasi 50,100, Dan 150 Mg/L	29
Gambar 4.4	Kurva Pertumbuhan <i>Azotobacter</i> A9 Pada Medium NB-Pbcl ₂ Dengan Konsentrasi 50,100, Dan 150 Mg/L	29
	Kurva Pertumbuhan	

Gambar 4.5	Azotobacter A1a, A5, Dan A9 pada Medium NB	31
Gambar 4.6	Efisiensi <i>Bioremoval</i> NB-Pbcl ₂ ...	35

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Timbal (Pb) merupakan logam berat yang keberadaannya secara alami dapat ditemukan di tanah, batuan, permukaan perairan dan atmosfer (Smith, 2012). Kadar timbal pada kerak bumi sekitar 15 mg/Kg. Sumber alami utama timbal dapat berasal dari *gelenai* (PbS), *gelesite* (PbSO₄), dan *cerrusite* (PbCO₃) (Effendi, 2003).

Menurut NHMRC (2009), seiring meningkatnya aktivitas manusia, kandungan timbal di biosphere mengalami peningkatan beberapa tahun terakhir. Penggunaan bahan bakar kendaraan yang mengandung timbal, pengolahan biji logam hasil pertambangan, pabrik pembuatan timbal, serta kegiatan antropogenik lainnya memberikan kontribusi dalam peningkatan kadar timbal di lingkungan (DHOCNY 2007). Timbal termasuk logam berat yang bersifat toksik baik pada hewan dan manusia (Olenara *et al.*, 2008), serta tidak memberikan keuntungan fungsional secara biologis terhadap makhluk hidup (Bruins dalam Turpeinen, 2002). Ion timbal (II) atau Pb²⁺ merupakan ion logam berat toksik yang dapat terakumulasi pada otot, diabsorpsi oleh tulang, ginjal, dan jaringan otak, serta memiliki potensi mengakibatkan berbagai gangguan kesehatan (Hiza, 2006; Auhim, 2014). Timbal mampu berikatan dengan enzim, ikatan tersebut dapat terjadi karena timbal mempunyai kemampuan untuk menggantikan gugus logam yang berfungsi sebagai kofaktor enzim. (Wardhayani, 2006).

Beberapa metode telah digunakan untuk menghilangkan logam berat dalam suatu lingkungan dengan metode presipitasi, pertukaran ion, ekstraksi, dan absorpsi (Auhim, 2014), namun metode tersebut membutuhkan biaya yang relatif besar. Bakteri merupakan mikroorganisme prokariot yang dapat ditemukan melimpah di alam, dan beberapa genera memiliki sifat resisten terhadap logam berat (Ruizbang *et al.*, 1990). Beberapa genera bakteri dilaporkan memiliki resistensi terhadap logam timbal

yaitu *Azotobacter* (Rasulov *et al.*, 2013), *Pseudomonas* (Wulandari, 2005), *Listeria* (Prasetya *et al.*, 2012), *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* (Arrizal *et al.*, 2013). Penggunaan bakteri sebagai agen *bioremoval* logam berat merupakan alternatif yang dapat diunggulkan karena mempunyai beberapa keuntungan, seperti biaya yang rendah, efisiensi yang tinggi, biosorbennya dapat diregenerasi, dan *sludge* yang dihasilkan relatif sedikit (Satya dan Larashati, 2012).

Azotobacter merupakan salah satu genus bakteri yang melimpah di rhizosfer tanah, salah satunya ditanah pertanian. *Azotobacter* mampu memfiksasi nitrogen bebas diudara, mekanisme tersebut dapat menyediakan unsur nitrogen dalam tanah (Holt, *et al.*, 1994). *Azotobacter* spp. yang diisolasi dari lahan *Eco Urban Farming* ITS telah diteliti resistensinya terhadap HgCl_2 dengan tingkat resistensi hingga 5 mg/L (Khotimah dan Zulaika, 2013), namun isolat tersebut belum diketahui resistensinya terhadap timbal. Oleh karena itu, dilakukan penelitian untuk mengetahui potensi dan tingkat resistensi isolat *Azotobacter* terhadap timbal yang nantinya dapat dimanfaatkan sebagai agen *Bioremoval*.

1.2 Rumusan Permasalahan

Bakteri *Azotobacter* spp. yang diisolasi dari lahan *Eco Urban Farming* ITS telah diketahui resisten terhadap logam HgCl_2 dan belum diketahui resisten terhadap PbCl_2 . Beberapa permasalahan dalam penelitian ini adalah :

- a. Apakah semua isolat *Azotobacter* spp. resisten terhadap PbCl_2 ?
- b. Bila resisten terhadap PbCl_2 , berapakah kemampuan isolat *Azotobacter* spp. tersebut melakukan *bioremoval* terhadap PbCl_2 ?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah penelitian ini adalah:

- a. Isolat *Azotobacter* yang digunakan dalam uji resistensi timbal adalah A1a , A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, dan A10
- b. Logam Pb yang digunakan adalah $PbCl_2$
- c. Isolat yang digunakan dalam uji kemampuan *bioremoval* logam timbal adalah 3 isolat yang lebih resisten dibanding isolat yang lain
- d. Konsentrasi $PbCl_2$ yang digunakan dalam uji *bioremoval* adalah hasil dari *range finding test*
- e. Pengukuran logam $PbCl_2$ menggunakan *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS) dengan panjang gelombang 283.3 nm.

1.4 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk:

- a. Mendapatkan isolat *Azotobacter* yang resisten terhadap logam timbal
- b. Mengetahui kemampuan *bioremoval* *Azotobacter* terhadap pemaparan logam timbal.

1.5 Manfaat

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah mendapatkan isolat *Azotobacter* yang mempunyai tingkat resistensi terhadap timbal dan mampu *me-removal* di lingkungan hidupnya sehingga dapat diaplikasikan sebagai agen *bioremoval* lingkungan tercemar logam timbal.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Timbal (Pb)

Timbal dengan simbol Pb bernomor atom 82 dalam sistem periodik dengan konfigurasi elektron $4f^{14} 5d^{10} 6s^2 6p^2$ dan termasuk golongan utama. Kulit bumi mengandung 16 ppm sedangkan pada batu-batuan sangat bervariasi. Timbal dapat ditemukan di alam sebagai unsur maupun senyawa. Aktivitas manusia menyebabkan konsentrasi timbal dalam lingkungan meningkat. Polusi timbal dapat terjadi di tanah, air, maupun udara karena penggunaannya yang sangat luas. Timbal dipakai dalam jumlah besar pada pabrik baterai, pabrik logam dan pewarna. Fardiaz (1992) mengatakan bahwa penggunaan timbal terbesar adalah pada produksi aki untuk mobil. Timbal juga banyak digunakan sebagai amunisi, pelapis kabel, pipa, bahan kimia dan pewarna. Selain itu, senyawa timbal khususnya tetra etil timbal (TEL) atau tetra metil timbal (TML) banyak digunakan dalam bahan bakar minyak sebagai anti ketukan. Dalam industri keramik, timbal digunakan sebagai pelapis pada pembuatan keramik dimana silikat sebagai bahan dasar akan bereaksi dengan timbal oksida membentuk suatu kompleks silikat. Logam Pb termasuk logam berat yang dikategori ke dalam bahan berbahaya dan beracun (B3). Jumlah logam Pb dalam tanah dapat menggambarkan kondisi tanah telah terjadi kontaminasi atau tidak terkontaminasi. Keberadaan logam berat di alam tidak mengalami transformasi (persisten), sehingga menyimpan potensi keracunan yang laten (Notodarmojo, 2005). Keberadaan logam berat dalam tanah perlu mendapatkan perhatian yang serius karena tiga hal, meliputi: 1) bersifat racun dan berpotensi karsinogenik; 2) logam dalam tanah pada umumnya bersifat *mobile* 3) mempunyai sifat akumulatif dalam tubuh manusia (Notodarmojo, 2005).

2.2 Toksisitas Timbal

Toksisitas timbal pada kesehatan manusia mempunyai pengaruh yang luas, dari gangguan syaraf, gangguan metabolisme tulang sampai kerusakan ginjal dan gangguan fungsi hati. (Sakir, 2008). Bahkan penelitian terakhir menunjukkan bahwa logam timbal memiliki sifat karsinogenik yang dapat merangsang terjadinya kanker pada manusia. Organ-organ tubuh yang menjadi tempat akumulasi timbal adalah liver, ginjal dan otak. Anak-anak dan balita memiliki resiko yang lebih tinggi terkena pencemaran bahan-bahan toksik. Jika dilihat dari resiko berat badan, balita dan anak-anak mengkonsumsi makanan dan minuman serta menghirup udara lebih banyak daripada orang dewasa. Paparan dalam waktu yang lama terhadap bahan toksik pada anak-anak menyebabkan penurunan Kecerdasan (IQ), kemampuan membaca dan gangguan perilaku yang menetap.

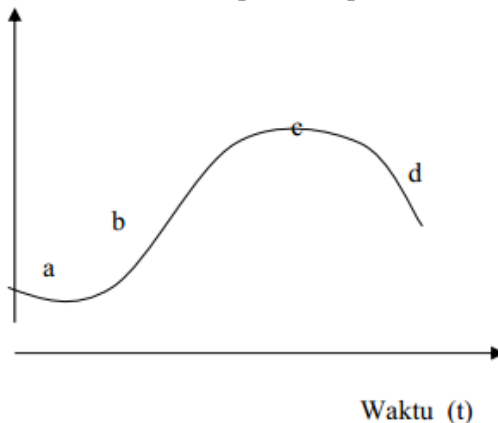
Toksisitas logam berat pada manusia berkaitan erat dengan akumulasinya pada jaringan sehingga menyebabkan gangguan proses fisiologis baik secara langsung maupun tidak langsung di tingkat molekuler. Timbal memiliki kemampuan untuk menimbulkan kerusakan oksidatif pada jaringan dan meningkatkan peroksidasi lemak, kerusakan DNA (Komousani, 2011). Logam-logam yang bersifat toksik meningkatkan produksi dari radikal bebas. Proses terjadinya kerusakan akibat timbal disebabkan berbagai faktor. Timbal secara langsung dapat menghambat kerja enzim, kemudian timbal juga dapat menghambat penyerapan mineral oleh tubuh. (Yushui, 2012) Selain itu timbal juga dapat menurunkan kadar antioksidan dan meningkatkan produksi radikal bebas. Ketidakseimbangan antara serangan oksidan dan pertahanan antioksidan pada jaringan dan sel mengarah pada terjadinya kerusakan organ. (Wang *et al.*, 2010).

Timbal merupakan salah satu bahan pencemar udara yang berbentuk partikulat. Baku mutu udara nasional untuk timbal, berdasarkan Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 41

tahun 1999 tentang pengendalian pencemaran udara adalah sebesar $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ untuk 24 jam pengukuran (Depkes RI, 1991). Sedangkan menurut PP RI Nomor 82 /2001 baku mutu timbal diperairan yaitu 0,03 ppm.

2.3 Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai pertambahan jumlah atau volume serta ukuran sel. Pada organisme prokariot seperti bakteri, pertumbuhan merupakan pertambahan volume dan ukuran sel dan juga sebagai pertambahan jumlah sel. Pertumbuhan sel bakteri biasanya mengikuti suatu pola pertumbuhan tertentu berupa kurva pertumbuhan sigmoid.



Gambar 2.1. Kurva Pertumbuhan Bakteri, Menunjukkan Empat Fase Pertumbuhan

Keterangan: a: fase lag; b: fase eksponensial; c: fase stasioner dan d: fase kematian populasi

(Brock & Madigan, 1991)

Perubahan kemiringan pada kurva tersebut menunjukkan transisi dari satu fase perkembangan ke fase lainnya. Nilai logaritmik jumlah sel biasanya lebih sering dipetakan daripada

nilai aritmatik. Logaritma dengan dasar 2 sering digunakan, karena setiap unit pada ordinat menampilkan suatu kelipatan-dua dari populasi. Kurva pertumbuhan bakteri dapat dipisahkan menjadi empat fase utama: fase lag (fase lamban atau lag phase), fase pertumbuhan eksponensial (fase pertumbuhan cepat atau log phase), fase stationer (fase statis atau stationary phase) dan fase penurunan populasi (decline). Fase-fase tersebut mencerminkan keadaan bakteri dalam kultur pada waktu tertentu. Di antara setiap fase terdapat suatu periode peralihan dimana waktu dapat berlalu sebelum semua sel memasuki fase yang baru.

Fase Lag. Setelah inokulasi, terjadi peningkatan ukuran sel, mulai pada waktu sel tidak atau sedikit mengalami pembelahan. Fase ini, ditandai dengan peningkatan komponen makromolekul, aktivitas metabolik, dan kerentanan terhadap zat kimia dan faktor fisik. Fase lag merupakan suatu periode penyesuaian yang sangat penting untuk penambahan metabolit ada kelompok sel, menuju tingkat yang setaraf dengan sintesis sel maksimum.

Fase Log/Pertumbuhan Eksponensial. Pada fase eksponensial atau logaritmik, sel berada dalam keadaan pertumbuhan yang seimbang. Selama fase ini, masa dan volume sel meningkat oleh faktor yang sama dalam arti rata-rata komposisi sel dan konsentrasi relatif metabolit tetap konstan. Selama periode ini pertumbuhan seimbang, kecepatan peningkatan dapat diekspresikan dengan fungsi eksponensial alami. Sel membelah dengan kecepatan konstan yang ditentukan oleh sifat intrinsik bakteri dan kondisi lingkungan. Dalam hal ini terdapat keragaman kecepatan pertumbuhan berbagai mikroorganisme. Waktu lipat dua untuk *E. coli* dalam kultur kaldu pada suhu 37°C, sekitar 20 menit, sedangkan waktu lipat dua minimal sel mamalia sekitar 10 jam pada temperatur yang sama.

Fase Stasioner. Pada saat digunakan kondisi biakan rutin, akumulasi produk limbah, kekurangan nutrisi, perubahan pH, dan faktor lain yang tidak diketahui akan mendesak dan mengganggu biakan, mengakibatkan penurunan kecepatan

pertumbuhan. Selama fase ini, jumlah sel yang hidup tetap konstan untuk periode yang berbeda, bergantung pada bakteri, tetapi akhirnya menuju periode penurunan populasi. Dalam beberapa kasus, sel yang terdapat dalam suatu biakan yang populasi selnya tidak tumbuh dapat memanjang, membengkak secara abnormal, atau mengalami penyimpangan, suatu manifestasi pertumbuhan yang tidak seimbang.

Fase Penurunan Populasi Atau Fase Kematian. Pada saat medium kehabisan nutrisi maka populasi bakteri akan menurun jumlahnya. Pada saat ini jumlah sel yang mati lebih banyak daripada sel yang hidup.

(Anonim, 2012).

2.4 Bakteri Resisten Pb

Resistensi bakteri terhadap logam timbal (Pb) dapat dilakukan bakteri gram negatif maupun gram positif, yang terdiri dari kelompok bakteri mesofil, halofil, maupun ekstremofil (Gupta *et al.*, 1998 dan Brown *et al.*, 2002). Resistensi tersebut berhubungan dengan gen yang terletak di kromosom, plasmid atau transposon yang mengatur mekanisme tersebut. Gambar 2.2 Mekanisme transpot Pb di dalam sel bakteri

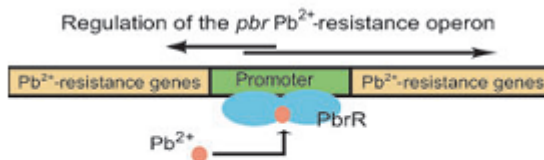


Figure 1. PbrR regulates the lead-resistance operon (*pbr*) in *Ralstonia metallidurans* strain CH34.

Gambar 2.2 Mekanisme transpot Pb di dalam sel bakteri

(Chen *et al.*, 2005).

Pbr operon merupakan operon yang unik, yang fungsinya kombinasi antara *uptake*, *efflux*, dan akumulasi ion Pb²⁺. Seluruh

gen resisten (*pbrTRABCD*) pada *pbr* operon diregulasi oleh PbrR protein, yang menginduksi terjadinya transkripsi dari promotor yang berbeda (Chen *et al.*, 2005).

2.5 *Bioremoval*

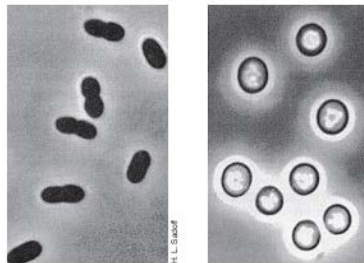
Bioremoval merupakan suatu keadaan ketika bahan pencemar terkonsentrasi dan terakumulasi didalam material biologi dan material biologi tersebut mampu *me-recovery* polutan sehingga dapat dibuang dan ramah lingkungan (Suhendrayatna, 2001). *Bioremoval* juga dapat diartikan suatu proses pengurangan kontaminan logam berat pada lingkungan yang memanfaatkan aktivitas biologis suatu organisme maupun mikroorganisme. *Bioremoval* merupakan pembentukan kompleks stabil antara logam berat yang bersifat kation dengan biopolimer seluler yang bermuatan negatif pada bakteri. Dinding sel bakteri yang terdiri dari peptidoglikan memiliki sifat anionik sehingga mampu mengikat logam berat yang bersifat kation dan terjadi interaksi elektrostatik (Suhendrayatna, 2001).

Bioremoval terjadi dengan dua cara yaitu *passive up take* serta *active up take*. Proses penyerapan secara pasif (*passive up take*) disebut juga biosorbsi sedangkan penyerapan aktif disebut bioakumulasi. Biosorbsi merupakan pengikatan ion logam berat pada dinding sel melalui dua cara. Pertama, pertukaran ion monovalen dan divalen pada dinding sel seperti Na, Mg dan Ca akan digantikan oleh ion logam berat. Kedua, terbentuknya senyawa kompleks antara ion logam berat dengan gugus fungsional protein pada dinding (Suhendrayatna, 2001).

Penyerapan aktif (bioakumulasi) merupakan mekanisme yang terjadi secara simultan pada sel hidup dengan konsumsi ion logam untuk pertumbuhan mikroorganisme. Logam berat dapat diendapkan pada proses metabolisme dan diekskresikan ke lingkungan (Suhendrayatna, 2001).

2.5 Genus *Azotobacter*

Azotobacter memiliki sel berbentuk oval dengan diameter 1,5-2,0 μm . *Azotobacter* bersifat pleomorfi, yaitu selnya dapat berbentuk batang sampai kokus. Selnya terdapat individu, berpasangan, atau mengelompok dengan bentuk tidak beraturan, dan kadang-kadang membentuk rantai dengan panjang bervariasi. *Azotobacter* tidak membentuk endospora tetapi membentuk cysta. *Azotobacter* dalam pewarnaan Gram menunjukkan Gram negatif. *Azotobacter* menunjukkan sifat motil karena memiliki flagela peritrik atau nonmotil. *Azotobacter* bersifat aerob tetapi masih dapat hidup dengan tekanan oksigen rendah. Bakteri ini termasuk dalam kemoorganotrop yang menggunakan karbon dari gula, alkohol, atau garam dari asam organik untuk tumbuh. *Azotobacter* mampu memfiksasi nitrogen sebanyak 10 mg N_2 setiap 1 gr glukosa yang dikonsumsi. Molibdenum dibutuhkan untuk fiksasi nitrogen tetapi dapat juga digantikan dengan vanadium. *Azotobacter* tidak memiliki enzim proteolitik sehingga menggunakan sumber nitrogen berupa nitrit dan garam amonium. *Azotobacter* juga menghasilkan enzim katalase untuk mengkatalis hidrogen peroksida yang dihasilkan pada proses metabolisme. *Azotobacter* dapat hidup pada range pH 4,8-8,5 dengan pH optimum untuk pertumbuhan dan fiksasi nitrogen 7,0-7,5. Habitat dari *Azotobacter* ini yaitu tanah dan air, dan ada juga yang berasosiasi dengan tumbuhan pada bagian akar (Hort et al., 1994).



Gambar 2.3 Bentuk sel *Azotobacter vinelandii*

(Madigan et al., 2009).

Azotobacter sp. memiliki kelebihan dibandingkan dengan bakteri penambat N atmosfer nonsimbiotik lainnya, karena mampu mensintesis hormon seperti IAA. Sintesis IAA pada bakteri melalui jalur asam indol piruvat. IAA yang disekresikan bakteri memacu pertumbuhan akar secara langsung dengan menstimulasi pemanjangan atau pembelahan sel. *Azotobacter* sp. dikenal sebagai penghasil polisakarida ekstraseluler seperti alginat dan polimer. Alginat dapat berfungsi sebagai enkapsulasi sel mikroba dan hewan serta untuk biosorpsi logam. Namun alginat dari *Azotobacter* sp. berfungsi melindungi nitrogenase sehingga meningkatkan fiksasi N (Sabra *et al.*, 2000). *Azotobacter* dapat memperbaiki pertumbuhan dan tingkat serapan N tanaman tahunan seperti pada tanaman lada dan tanaman panili (Ruhnayat, 2007).

Isolasi *Azotobacter* yang dilakukan pada lahan *Eco Urban Farming* ITS menghasilkan 10 isolat dengan kode A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, dan A10. Isolat yang telah dipurifikasi kemudian dilanjutkan dengan pengamatan karakteristik morfologi koloni, pewarnaan Gram dan pewarnaan cysta (Khotimah dan Zulaika, 2013). Keberadaan cysta merupakan karakter kunci pada genus *Azotobacter*. Menurut (Madigan *et al.*, 2009), *Azotobacter* dapat membentuk struktur istirahat (*resting cell*) yang disebut cysta dimana sel dikelilingi oleh dinding sel yang tebal.



Gambar 2.4 Bentuk cyst *Azotobacter*

(Khotimah dan Zulaika, 2013).

BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2014 - Mei 2015 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA-ITS.

3.2 Metode yang Digunakan

3.2.1 Persiapan subkultur dan uji rekonfirmasi isolat *Azotobacter*

Subkultur merupakan metode peremajaan isolat yang akan digunakan dalam penelitian. Masing-masing isolat *Azotobacter* diinokulasi secara aseptis dengan metode streak kontinyu pada medium Nutrient Agar (NA) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam sebelum dilakukan perlakuan (Lampiran 1). Keberhasilan subkultur ditandai dengan tumbuhnya koloni bakteri. Uji rekonfirmasi yang dilakukan berdasarkan *Generic assignment* sesuai karakter kunci genus *Azotobacter* menggunakan panduan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994). meliputi pengamatan bentuk sel dan sifat pleiomorfik (Pewarnaan sederhana dan pewarnaan Gram), pengamatan cysta, uji katalase, dan pengamatan motilitas.

Pewarnaan Sederhana. Pewarnaan sederhana dilakukan untuk mengetahui morfologi dan ukuran sel. isolat A1a , A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, dan A10 masing-masing digoreskan pada kaca objek yang sebelumnya telah ditetesi aquades steril. Isolat difiksasi setelah kering, kaca objek ditetesi dengan *methylene blue* dan diiamkan selama ± 10 menit. Kemudian preparat dibilas dengan aquades dan dikering anginkan. Preparat diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.

Pewarnaan Gram. Untuk mengetahui apakah bakteri isolat termasuk bakteri Gram positif atau. Isolat yang sudah difiksasi ke kaca obyek ditetesi dengan larutan *crystal violet* secara merata dan ditunggu selama 1 menit. Kemudian kaca obyek dibilas

dengan akuades. Setelah itu ditetesi dengan iodine secara merata dan ditunggu selama 1 menit. Kaca obyek dibilas dengan akuades. Lalu kaca obyek ditetesi dengan larutan alkohol 70% selama 15 detik. Kemudian dibilas dengan akuades. Setelah itu ditetesi dengan safranin secara merata dan ditunggu selama 1 menit. Setelah 1 menit dibilas dengan akuades dan dikering-anginkan. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop perbesaran 400x.

Pengamatan Kista. Kista merupakan ciri spesifik genera *Azotobacter*. Isolat A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, dan A10 diinokulasikan pada medium *Burk* (Lampiran 2) diinkubasi selama 7 hari. Kemudian dibuat preparat pada kaca objek dan diwarnai dengan pewarna geimsa. Pengamatan kista dilakukan dengan bantuan mikroskop perbesaran 400x.

Uji Katalase. Uji katalase digunakan untuk mengetahui apakah isolat mampu menghasilkan enzim katalase yang mampu merubah H_2O_2 menjadi oksigen. Isolat bakteri digoreskan secara aseptis ke gelas objek dan kemudian permukaannya ditetaskan sebanyak 1 tetes larutan H_2O_2 3%. Hasil positif ditandai dengan timbulnya gas atau gelembung udara di sekitar goresan bakteri tersebut.

Pengamatan Kemampuan Fermentasi dan Motilitas. Pengamatan kemampuan fermentasi dan motilitas dilakukan dengan menginokulasikan isolat pada medium TSIA (*triple sugar iron agar*), peninokulasian dilakukan secara aseptis dengan menggunakan jarum tanam tajam. Isolat diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Pengamatan dilakukan dengan melihat perubahan warna yang terjadi pada medium TSIA. Hasil positif ditunjukkan apabila medium berubah warna menjadi kuning. Motilitas positif bila koloni bakteri tumbuh menyebar disekitar tempat inokulasi.

Berdasarkan hasil diatas, selanjutnya dilakukan *generic assignment* dengan *profile matching* sesuai dengan karakter kunci berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* sebagai panduan (Holt *et al.*, 1994).

3.2.2 Uji resistensi dan *range finding test Azotobacter* terhadap logam $PbCl_2$

Uji Resistensi dilakukan untuk seleksi awal pada isolat yang resisten terhadap logam $PbCl_2$. Satu ose isolat diinokulasikan secara aseptik dengan metode streak pada medium NA slant dengan konsentrasi 1 mg/L $PbCl_2$ dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Isolat yang tumbuh merupakan isolat yang resistensi terhadap logam $PbCl_2$.

Range finding test merupakan metode yang digunakan untuk mendapatkan konsentrasi optimal yang mampu ditoleransi isolat *Azotobacter* terhadap logam $PbCl_2$. Isolat *Azotobacter* diinokulasikan secara aseptis pada medium NA *slant* yang mengandung $PbCl_2$ dengan konsentrasi 0,1, 10, 20 (mg/L) dan seterusnya sampai dengan konsentrasi yang mampu ditoleransi isolat *Azotobacter*. Kultur diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Isolat yang mampu tumbuh pada medium NA- $PbCl_2$ adalah isolat yang resisten. Isolat yang digunakan yaitu 3 isolat yang memiliki tingkat resistensi terhadap $PbCl_2$ yang lebih tinggi dibandingkan isolat lainnya. Konsentrasi $PbCl_2$ yang digunakan dalam uji *Bioremoval* adalah level dibawah konsentrasi maksimal yang dapat ditoleransi konsentrasi oleh isolat *Azotobacter*.

3.2.3 Uji viabilitas *Azotobacter* pada medium NB- $PbCl_2$

Uji Viabilitas *Azotobacter* digunakan untuk mengetahui pola pertumbuhan bakteri pada kondisi tercekaman logam $PbCl_2$. Secara aseptis satu ose isolat diinokulasi pada medium NB (Lampiran 2) 20 ml dalam Erlenmeyer, diinkubasi dalam suhu ruang dan di shaker (100 rpm) selama 24 jam. Kemudian starter diinokulasikan pada medium NB $PbCl_2$ volume 180 ml dengan konsentrasi 50, 100 dan 150 mg/L.

Sampling dilakukan mulai dari jam ke-0 sampai jam ke-24 dengan interval tiap 2 jam. Sebanyak 2 ml sampel pada tiap Erlenmeyer diambil secara aseptis dan dimasukkan kedalam kuvet. Kemudian dilakukan pengukuran suspensi kultur menggunakan Spektrofotometer dengan panjang gelombang (λ)

600 nm. Larutan blanko yang digunakan adalah medium NB-PbCl₂.

Data Optical Density (OD) yang didapat kemudian dibuat kurva pertumbuhan dengan sumbu x sebagai waktu (t) dan sumbu y sebagai Optical Density (OD). Kontrol adalah kultur tanpa PbCl₂.

3.2.4 Penentuan umur perlakuan *bioremoval* isolat *Azotobacter* terhadap logam PbCl₂

Penentuan Umur Perlakuan Bioremoval Isolat *Azotobacter* terhadap Logam PbCl₂ dilakukan untuk mengetahui μ jam perlakuan *bioremoval*. Secara aseptis satu ose isolat diinokulasi pada medium NB (Lampiran 2) 20 ml dalam Erlenmeyer, diinkubasi dalam suhu ruang dan di shaker (100 rpm) selama 24 jam. Kemudian starter diinokulasikan pada 180 ml medium NB tanpa logam.

Sampling dilakukan mulai dari jam ke-0 sampai jam ke-24 dengan interval tiap 2 jam. Sebanyak 2 ml sampel pada tiap Erlenmeyer diambil secara aseptis dan dimasukkan kedalam kuvet. Kemudian dilakukan pengukuran suspensi kultur menggunakan Spektrofotometer dengan panjang gelombang (λ) 600 nm. Larutan blanko yang digunakan adalah medium NB-PbCl₂.

Data Optical Density (OD) yang didapat kemudian dibuat kurva pertumbuhan dengan sumbu x sebagai waktu (t) dan sumbu y sebagai Optical Density (OD). Setelah diketahui fase pertumbuhannya maka dapat ditentukan pada jam seberapa bakteri mengalami fase lag hingga fase kematian.

Berdasarkan kurva pertumbuhan isolat *Azotobacter* pada medium NB tanpa PbCl₂ akan didapatkan umur isolat yang digunakan untuk uji *bioremoval* PbCl₂, yaitu (μ) jam. Umur perlakuan (μ) jam dihitung berdasarkan rumus berikut,

$$\mu = \frac{\text{waktu akhir fase log} - \text{waktu awal fase log}}{2}$$

3.2.5 Uji *Bioremoval* Logam PbCl₂

Pembuatan Larutan Stock PbCl₂ 500 mg/L

Larutan stock PbCl₂ dibuat dengan melarutkan 50 mg PbCl₂ dalam 100 ml aquades steril, sehingga didapatkan konsentrasi stock PbCl₂ 500 mg/L.

Pembuatan Starter dan *stock culture* *Azotobacter*

Subkultur isolat *Azotobacter* pada agar *slant* diinokulasi secara aseptis pada medium NB dengan volume 15 ml inkubasi dilakukan diatas *rotary shaker* (100 rpm) pada suhu ruang selama 24 jam. Kemudian starter dimasukkan kedalam Erlenmeyer yang berisi 85 ml medium NB diinkubasi diatas *rotary shaker* (100 rpm) pada suhu ruang selama μ jam sehingga didapatkan *stock culture* isolat *Azotobacter* sebanyak 100 ml.

Uji *Bioremoval*

Perlakuan konsentrasi PbCl₂ yang digunakan sesuai dengan *range finding test* yang telah dilakukan. Uji *Bioremoval* merupakan metode yang digunakan untuk mengetahui kemampuan isolat *Azotobacter* dalam meremoval logam PbCl₂.

Stock culture isolat *Azotobacter* dihitung kepadatan selnya dengan menggunakan hemasitometer sebelum dilakukan uji *bioremoval*. Kemudian setiap *stock culture* isolat usia μ jam secara aseptis dimasukkan pada 4 Erlenmeyer dengan volume tiap tabung 50 ml. Perlakuan perbedaan konsentrasi dilakukan dengan menambahkan stok PbCl₂ sesuai dengan konsentrasi yang digunakan (kontrol, 50, 100, dan 150), selanjutnya Erlenmeyer dikocok hingga homogen. Inkubasi dilakukan diatas *rotary shaker* (100 rpm) pada suhu ruang selama 24 jam. Sampling kemampuan *Azotobacter* dalam meremoval logam PbCl₂ dilakukan setelah inkubasi 24 jam. Kultur diambil 9 ml dimasukkan pada tabung sentrifus dan disentrifugasi 4000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan sel *Azotobacter* dan filturnya. Filtrat dari setiap perlakuan diambil dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes HNO₃ kemudian dipanaskan pada suhu $\leq 85^{\circ}\text{C}$ selama ± 5 menit. Dilakukan analisis kemampuan *Azotobacter* dalam mengakumulasi logam Pb dengan

mengukur konsentrasi logam $PbCl_2$ yang terdapat pada medium. Setiap perlakuan dilakukan 2 kali pengulangan.

Pengukuran konsentrasi $PbCl_2$ dilakukan dengan menggunakan *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS) dengan panjang gelombang 283.3 nm. Konsentrasi logam Pb pada filtrat medium merupakan konsentrasi logam Pb yang tidak diakumulasi oleh *Azotobacter* uji, sehingga perbedaan konsentrasi awal (medium tanpa inokulum *Azotobacter*) dengan konsentrasi akhir (medium dengan inokulum *Azotobacter*) merupakan konsentrasi logam Pb yang dapat di-*removal* diakumulasi sel *Azotobacter*. Perhitungan jumlah logam Pb yang di-*removal* isolat *Azotobacter* dan efisiensi *removal*-nya dihitung dengan formula sebagai berikut:

$$R = K_o - K_a \text{ (mg/L)}$$

$$E = \frac{R}{K_o} \times 100\%$$

Keterangan :

R = Konsentrasi logam Pb yang di-*removal* sel *Azotobacter*; K_o = Konsentrasi awal logam Pb tanpa inokulum *Azotobacter*; K_a = Konsentrasi akhir logam Pb pada medium dengan inokulum *Azotobacter*; E = Efisiensi *bioremoval* genus *Azotobacter*.

3.2.6 Viabilitas *Azotobacter* pada Cekaman $PbCl_2$

Uji viabilitas digunakan untuk mengetahui kemampuan hidup *Azotobacter* setelah terpapar logam $PbCl_2$. Sebanyak 100 μ l kultur *Azotobacter* yang telah terpapar $PbCl_2$ dinokulasi pada medium NA menggunakan metode *pour plate*, selanjutnya inkubasi 24 jam.

Pengamatan dilakukan secara kualitatif melihat pertumbuhan isolat. Perhitungan koloni yang tumbuh dihitung dengan metode CFU (*colony forming units*). Jika CFU > 300 maka dilakukan pengenceran sampai didapatkan CFU 30-300 koloni.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode deskriptif untuk uji resisten, metode kuantitatif untuk uji *bioremoval*, dan metode kualitatif untuk uji viabilitas. Penelitian dengan metode kuantitatif menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap), dengan 3 isolat berbeda. Adanya perbedaan perlakuan dianalisis dengan ANNOVA pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 5\%$). Uji beda nyata antar perlakuan dilakukan dengan uji beda nyata terkecil.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Rekonfirmasi Genus *Azotobacter* spp.

Uji rekonfirmasi dilakukan untuk memvalidasi bahwa isolat yang akan digunakan adalah genus *Azotobacter*. Rekonfirmasi menggunakan metode *Generic assignment* dengan *Profile matching* sesuai karakter kunci genus *Azotobacter* menggunakan panduan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994).

Semua isolat memiliki bentuk sel ovoid, kecuali isolat A3, A7, A8 dan A9 berbentuk basil pendek, serta bersifat pleiomorfik dimana saat pengamatan bentuk bakteri dengan pewarnaan *methylene blue* menunjukkan bahwa hampir semua isolat memiliki bentuk sel basil pendek kecuali A2, dan A9 yang memiliki bentuk ovoid, hasil yang berbeda ditunjukkan pada pengamatan tanpa pewarnaan, hampir semua isolat berbentuk kokus kecuali A1a dan A9 berbentuk basil pendek. Pengamatan cysta menunjukkan hasil yang positif pada semua isolat uji. Isolat A1a, A1b, A3 dan A9 bersifat motil, sedangkan isolat A2, A5, A6, A7, A8 dan A10 bersifat non motil. Semua isolat uji bersifat aerob dan menunjukkan hasil positif pada uji katalase. Hasil uji rekonfirmasi ditampilkan pada tabel 4.1

Tabel 4.1. *Profile Matching* Isolat Uji dengan Karakter Kunci *Azotobacter* (Holt *et al.*, 1994)

Karakter Kunci	Isolat									
<i>Azotobacter</i>	A1a	A1b	A2	A3	A5	A6	A7	A8	A9	A10
Basil/ovoid	+/+	+/+	-/+	+/-	+/+	+/+	+/-	+/-	-/+	./+/+
Pleimorfik	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cysta	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilitas/non motil	+/-	+/-	+/-	+/-	-/+	-/+	+/-	-/+	+/-	-/+
Aerob	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Menurut Holt *et al.*, (1994) karakter kunci *Azotobacter* yaitu, memiliki sel berbentuk oval dengan diameter 1,5-2,0 μm . *Azotobacter* bersifat pleomorfi, yaitu sel bakteri yang dapat berubah ini sesuai dengan medium dan umur isolat, selnya dapat berbentuk batang sampai kokus. *Azotobacter* tidak membentuk endospora tetapi membentuk cysta. *Azotobacter* dalam pewarnaan Gram menunjukkan Gram negatif. *Azotobacter* menunjukkan sifat motil karena memiliki flagela *peritrichous* dan ada beberapa yang nonmotil. *Azotobacter* bersifat aerob tetapi masih dapat hidup dengan tekanan oksigen rendah. Auhim & Odaa pada tahun 2013 menambahkan bahwa *Azotobacter* memiliki karakter fisiologis positif dalam uji katalase.

Berdasarkan hasil uji rekonfirmasi dan *profile matching* karakter kunci genus *Azotobacter* maka isolat uji adalah genus *Azotobacter*.

4.2 Resistensi dan *Range Finding Test Azotobacter Terhadap PbCl₂*

Uji resistensi dilakukan untuk mengetahui tingkat resistensi isolat *Azotobacter* dan untuk mengetahui *range finding test* konsentrasi PbCl_2 untuk perlakuan. Hasil uji resistensi menunjukkan bahwa setiap isolat memiliki respon yang berbeda-beda terhadap logam PbCl_2 . Hal ini dibuktikan dengan adanya perbedaan konsentrasi yang mampu ditolelir oleh isolat *Azotobacter* uji. Lima isolat *Azotobacter* yaitu A1a, A1b, A3, A9, dan A10 mampu tumbuh dengan baik pada medium NA- PbCl_2 sampai konsentrasi 300 mg/L. *Azotobacter* A5 menunjukkan resistensi yang baik hingga konsentrasi 100 mg/L, namun pada konsentrasi 300 mg/L isolat kurang mampu mentolelir PbCl_2 . Isolat A2, A6 dan A8 menunjukkan penurunan kemampuan pertumbuhan seiring meningkatnya konsentrasi PbCl_2 , sedangkan isolat A7 tidak resisten terhadap PbCl_2 walau pada konsentrasi 0,1 mg/L. Hasil uji resistensi secara lengkap ditampilkan pada tabel 4.2 dan Gambar 4.1

Tabel 4.2. Resistensi Isolat *Azotobacter* terhadap PbCl₂

Kode Isolat	Pertumbuhan Isolat <i>Azotobacter</i> pada medium NA-PbCl ₂ (mg/L)			
	0,1	50	100	300
A1a	+++	+++	+++	+++
A1b	+++	+++	+++	+++
A2	+++	++	++	++
A3	+++	+++	+++	+++
A5	+++	+++	+++	+
A6	+++	+++	+++	++
A7	-	-	-	-
A8	+++	++	++	++
A9	+++	+++	+++	+++
A10	+++	+++	+++	+++

Keterangan:

+++; sangat resisten; ++: resisten; +: cukup resisten; -: tidak resisten.

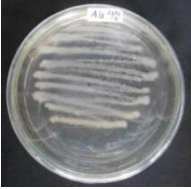







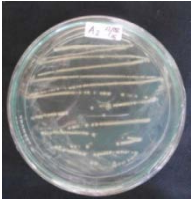



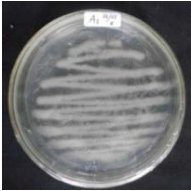



Koloni bakteri yang dimasukkan kategori tumbuh ditentukan dari adanya pertumbuhan bakteri pada seluruh garis yang dibuat menggunakan metode *streak plate*. Isolat yang sangat resisten jika tumbuh $\geq 75\%$ dari goresan yang dibuat, resisten jika isolat tumbuh 50-75%, cukup resisten jika tumbuh $\leq 25\%$, dan tidak resisten jika tidak tumbuh sama sekali. Resistensi *Azotobacter* terhadap PbCl₂ karena isolat tersebut mampu menghasilkan kista yang resisten terhadap cekaman lingkungan termasuk logam.

Menurut Vatamaniuk *et al.* (2000), logam berat, termasuk Pb, memiliki efek negatif terhadap produksi enzim dan dapat menyebabkan berkurangnya produksi Eksopolisakarida (EPS). *Azotobacter* mampu mengembangkan sistem resistensi terhadap logam berat melalui EPS yang mengkelat logam, selain itu EPS yang dihasilkan *Azotobacter* mampu meningkatkan mobilisasi logam berat karena EPS dapat bertindak seperti siderofor (Entiazi *et al.*, 2004). Gadd (1993) menyatakan bahwa bakteri yang

resisten (tahan) terhadap logam berat disebabkan kemampuan untuk mendetoksifikasi pengaruh logam berat dengan adanya protein atau material granuler seperti polifosfat di dalam sel yang mampu mengikat Pb dan Cd.

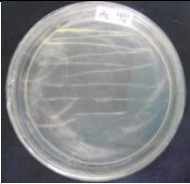



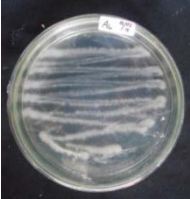



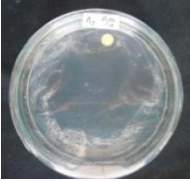
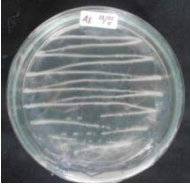



Menurut Tarpenne, *et al.*, (2007), metabolisme internal resistensi mikroorganisme terhadap logam berat dapat melalui mekanisme penjebakan atau terikat dengan intaseluler polimer seperti metallothionein. Metallothionein (MT) merupakan protein pengikat logam (*metal binding protein*) yang mengandung gugus thiol (-SH) serta terkandung asam amino sistein sekitar 30%. Asam amino sistein dan thiol menyusun metallothionein dengan komposisi tinggi dan berakibat daya afinitasnya kuat pada logam. Metallothionein memiliki kespesifikan terhadap logam, dan MT hanya mengikat satu jenis logam, seperti MT pengikat Cd, MT pengikat Hg, dan MT pengikat Pb.

Azotobacter memiliki kemampuan resistensi terhadap $PbCl_2$ karena memiliki gen resisten terhadap logam timbal. Gen resisten terhadap logam berat ini terdapat pada plasmid dan kromosom bakteri. Gen yang mengatur resistensi terhadap logam timbal adalah gen *pbr* operon yang terdiri dari A,B,C, dan D. Gen-gen ini menyandi protein struktural dan enzimatis yang berfungsi untuk proses bioakumulasi dan biosorpsi logam berat (Arinda, *et al.*, 2013). Mekanisme resistensi *Azotobacter* terhadap logam timbal secara ekstraselular diperankan oleh Eksopolisakarida. Eksopolisakarida (EPS) memiliki sifat mengikat polutan logam (Janecka *et al.*, 2002). Polimer ini larut di dalam air, diikat lemah oleh matriks tanah, dan setelah mengadsorpsi logam tidak mudah dimineralisasi sehingga berpotensi *meremoval* logam di dalam tanah. Alginat, merupakan jenis EPS yang dihasilkan *Azotobacter*. Alginat dari *Azotobacter* mampu *meremoval* logam toksik seperti Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} (Rasoluv *et al.*, 2013).

Kode Isolat	Pertumbuhan Isolat <i>Azotobacter</i> pada medium NA-PbCl ₂ (mg/L)			
	0,1	50	100	300
A1a				
A1b				
A2				
A3				

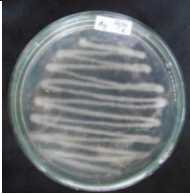



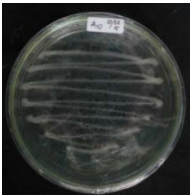



Gambar 4.1. Resistensi Isolat pada Medium NA-PbCl₂

Lanjutan gambar 4.1

Kode isolat	0,1	50	100	300
A5				
A6				
A7		Tidak tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh
A8				

Gambar 4.1. Resistensi Isolat pada Medium NA-PbCl₂

Lanjutan gambar 4.1

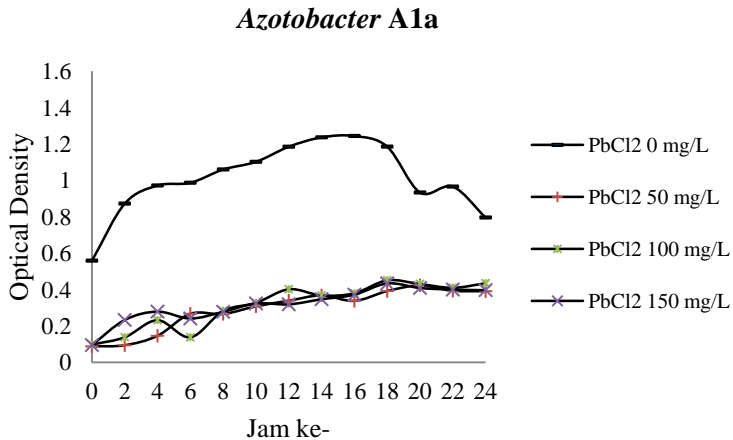
Kode isolat	0,1	50	100	300
A9				
A10				

Gambar 4.1. Resistensi Isolat pada Medium NA-PbCl₂

Berdasarkan uji *range finding test* yang dilakukan, maka konsentrasi PbCl₂ yang digunakan untuk uji *bioremoval* adalah tiga konsentrasi dibawah konsentrasi maksimal yaitu 50, 100, dan 150 mg/L. Sedangkan Isolat yang dipilih dalam uji *bioremoval* adalah *Azotobacter* A1a, A5, dan A9, karena isolat tersebut memiliki resistensi yang baik terhadap PbCl₂ hingga konsentrasi 300 mg/L serta isolat tersebut dilaporkan resisten terhadap HgCl₂ hingga 5 mg/L (Khotimah & Zulaika, 2014).

4.3 Viabilitas Isolat *Azotobacter* A1a, A5 dan A9 yang Tercekam Logam PbCl₂

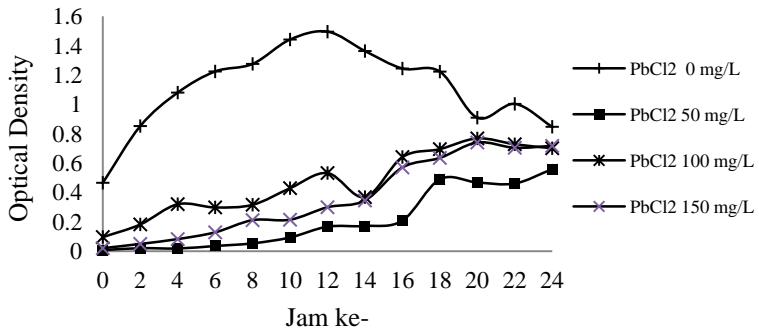
Pembuatan kurva pertumbuhan bertujuan untuk mengetahui kemampuan bertahan hidup atau viabilitas isolat *Azotobacter* terpilih pada medium yang mengandung PbCl₂.



Gambar 4.2. Kurva pertumbuhan *Azotobacter* A1a pada medium NB-PbCl₂ dengan konsentrasi 50,100, dan 150 mg/L

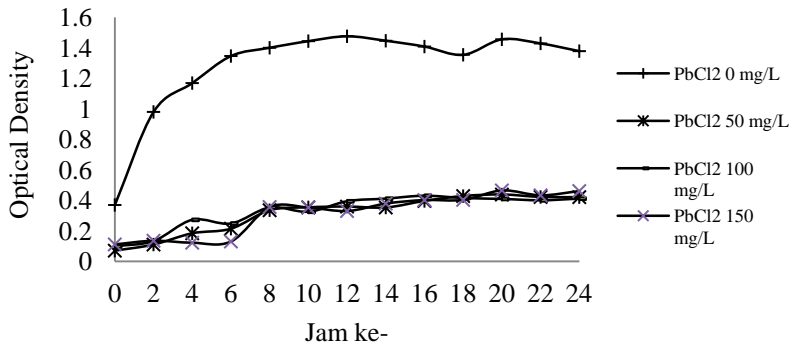
Kurva pertumbuhan dengan logam menunjukkan adanya penurunan viabilitas bila dibandingkan dengan kurva pertumbuhan tanpa logam. Seiring peningkatan konsentrasi PbCl₂ yang diberikan, semakin menunjukkan adanya pengaruh timbal terhadap pola pertumbuhan *Azotobacter* (Gambar 4.2-4.4). Pertumbuhan *Azotobacter* A1a, A5 dan A9 pada medium tanpa penambahan logam Pb menunjukkan OD $\geq 1,244$. Kurva pertumbuhan pada semua isolat *Azotobacter* menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir seragam dengan OD maksimal mencapai $\pm 0,4$ kecuali *Azotobacter* A5 mencapai OD $\pm 0,6$. Hal ini menunjukkan bahwa PbCl₂ dapat mempengaruhi pola pertumbuhan genus *Azotobacter*.

Azotobacter A5



Gambar 4.3. Kurva pertumbuhan isolat *Azotobacter* A5 pada medium NB-PbCl₂ dengan konsentrasi 50,100, dan 150 mg/L

Azotobacter A9



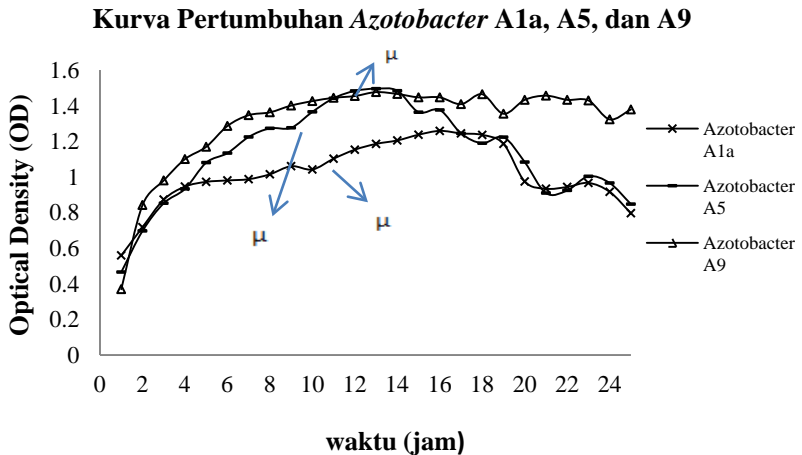
Gambar 4.4. Kurva pertumbuhan isolat *Azotobacter* A9 pada medium NB-PbCl₂ dengan konsentrasi 50,100, dan 150 mg/L

Hasil uji isolat *Azotobacter* A1a dan A9 resisten terhadap PbCl_2 hingga 300 mg/L yang ditandai isolat tumbuh dengan baik pada medium nutrient agar yang mengandung PbCl_2 , namun pada medium cair (NB) isolat menunjukkan sensitifitas terhadap PbCl_2 yang ditandai dengan nilai kerapatan sel yang cenderung rendah.

Perbedaan wujud medium yang digunakan dalam uji resistensi dan viabilitas berpengaruh terhadap pertumbuhan dan viabilitas meskipun nutrisi pada medium yang digunakan sama. Pada medium padat, pertumbuhan bakteri melekat pada permukaan medium (*attached growth*) dan PbCl_2 yang diabsorb oleh bakteri terbatas, sedangkan pada medium cair tipe pertumbuhan bakteri menyerupai suspensi (*suspended growth*) sehingga peluang sel bakteri kontak langsung dengan PbCl_2 lebih tinggi (Li-C, 2007). Hidayah dan Sovitri (2012) menambahkan bahwa bakteri dalam keadaan tersuspensi akan tumbuh merata disemua bagian medium baik di permukaan, di kolom air, atau di dasar.

4.4 Penentuan Umur Isolat *Azotobacter* A1a, A5 dan A9 untuk Perlakuan *Bioremoval* Logam PbCl_2

Penentuan umur perlakuan isolat *Azotobacter* A1a, A5 dan A9 bertujuan untuk mengoptimalkan aktivitas *bioremoval*. Berdasarkan kurva pertumbuhan yang didapat, diketahui umur perlakuan (μ jam) untuk uji *bioremoval* PbCl_2 adalah 9 jam untuk *Azotobacter* A1a, 7 jam untuk *Azotobacter* A9, dan 9,5 jam untuk *Azotobacter* A7 (Gambar 4.5).



Gambar 4.5. Kurva pertumbuhan *Azotobacter* A1a, A5, dan A9 pada medium NB

Pada saat μ jam atau pertengahan fase eksponensial, biomassa bakteri meningkat, jumlah sel bakteri membelah dua kali lipat. Pemilihan umur perlakuan pada pertengahan fase eksponensial, karena pada fase ini sel tumbuh dan membelah dengan cepat, sehingga diharapkan dapat mempercepat fase adaptasi serta mampu bertahan hidup ketika dipindahkan pada medium dengan logam untuk *bioremoval*. Pertengahan fase eksponensial dipilih sebagai umur perlakuan, karena pada awal fase eksponensial terlalu dekat dengan fase lag sehingga isolat belum tumbuh secara optimal. Sedangkan jika umur perlakuan diambil pada fase eksponensial akhir, pertumbuhan isolat sudah mulai menurun menuju fase stasioner.

Kurva pertumbuhan isolat *Azotobacter* A1a, A5, dan A9 tanpa penambahan $PbCl_2$ memiliki pola pertumbuhan yang hampir sama. Fase adaptasi cenderung singkat, hal ini disebabkan medium yang digunakan untuk inkubasi dan starter sama sehingga bakteri cepat menyesuaikan dengan lingkungan baru. Menurut Khotimah dan Zulaika (2014), inokulum yang

diinokulasikan pada medium baru yang sama ketika fase eksponensial, maka pertumbuhan inokulum akan melanjutkan fase eksponensial tanpa melalui fase adaptasi kembali.

Hogg (2005) mengemukakan, fase eksponensial merupakan fase pada mikroorganisme yang tengah dalam kondisi sel-sel baru terbentuk dengan laju yang konstan dan dalam keadaan stabil dimana sel mikroorganisme membelah dengan optimal diwaktu *doubling time* sehingga pada umumnya hal ini dapat dijumpai pada pertengahan fase eksponensial. Muslihah *et al* (2011) menambahkan, dalam fase eksponensial bakteri membutuhkan energi yang lebih tinggi untuk menunjang kebutuhan nutrisinya. Matthew *et al* (2011) menyatakan bahwa pertumbuhan bakteri pada fase eksponensial adalah kondisi optimum untuk melakukan mekanisme akumulasi logam.

4.5 Bioremoval PbCl₂

Uji *bioremoval* dilakukan untuk mengetahui jumlah Pb yang dapat di-*remove* oleh *Azotobacter* dari medium. Medium yang digunakan adalah NB-PbCl₂ 50, 100 dan 150 mg/L. Umur kultur uji sesuai dengan μ jam pada masing-masing isolat *Azotobacter*.

Berdasarkan pengukuran AAS, konsentrasi perlakuan kontrol (medium NB-PbCl₂ tanpa inokulum) konsentrasi 50, 100 dan 150 mg/L PbCl₂ terjadi penurunan menjadi 36,84, 77,91 dan 111,85 mg/L (Tabel 4.3). Penurunan konsentrasi PbCl₂ ini dapat terjadi karena ion Pb²⁺ dapat berikatan dengan komponen senyawa dari medium NB sehingga saat dianalisis konsentrasi ion logam tidak sama dengan konsentrasi awal perlakuan.

Menurut Rao *et al.* (1998), logam memiliki kemampuan berikatan dengan komponen medium NB yaitu pepton dan *meat extract*. Adanya ikatan logam dengan medium juga dapat menyebabkan kadar logam yang terdapat didalam medium semakin berkurang. Ion logam yang bermuatan positif akan berikatan dengan ion yang bermuatan negatif penyusun pepton dan *meat*. Terdapat protein yang terkandung dalam medium nutrient broth. Protein sendiri terdiri dari protein struktural dan

fungsional. Salah satu protein fungsional adalah enzim metaloprotease. Metaloprotease merupakan enzim protease (pendegradasi protein) yang menggunakan ion logam untuk mengaktifkan kerja enzimanya.

Berdasarkan hasil pada tabel 4.3 maka konsentrasi awal sebagai perlakuan adalah 36,84; 77,91 dan 111,85 mg/L.

Tabel 4.3. Konsentrasi PbCl₂ pada Medium Kontrol

K. Perlakuan (mg/L)	K. terukur AAS* (mg/L)
50	36,84
100	77,91
150	111,85

* Analisis Pb dilakukan di Balai Riset dan Standarisasi Industri Surabaya yang bersertifikasi KAN (Komite Akreditasi Nasional) LP-213-1DN.

Logam Pb²⁺ yang mampu di *remove* oleh *Azotobacter* uji menunjukkan perbedaan pada masing-masing isolat, dan setiap isolat memiliki kemampuan *bioremoval* yang optimal pada konsentrasi perlakuan yang berbeda (Tabel 4.4). *Azotobacter* A1a mampu *meremoval* sebesar 3.733 mg/L pada pemaparan PbCl₂ 36,84 mg/L, meningkat kemampuan *bioremoval*nya menjadi 8,825 mg/L pada konsentrasi 77,91 mg/L, dan mengalami penurunan *bioremoval* sebesar 7,975mg/L pada konsentrasi 111,85 mg/L PbCl₂.

Berdasarkan Tabel 4.4 *Azotobacter* A5 hanya mampu *meremoval* 0,355 mg/L dari konsentrasi awal 36,84 mg/L PbCl₂, pada konsentrasi 77,91 mg/L PbCl₂ *Azotobacter* A5 menunjukkan penurunan kemampuan *bioremoval*nya sebesar 0,170 mg/L, namun pada konsentrasi 111,85 mg/L PbCl₂ kemampuan *bioremoval* A5 mengalami peningkatan yang cukup signifikan dari konsentrasi uji yang lain yaitu sebesar 2,375 mg/L.

Hasil pengukuran kandungan Pb pada *Azotobacter* A9 di konsentrasi 36,84 mg/L PbCl₂ lebih rendah dibandingkan kontrol sehingga data tersebut tidak dapat dianalisis, namun pada konsentrasi 77,91 mg/L PbCl₂ *Azotobacter* A9 mampu

meremoval sebanyak 6.618 mg/L, sedangkan pada konsentrasi 111,85 mg/L *PbCl₂* *Azotobacter* A9 mengalami penurunan kemampuan *bioremoval* yaitu 0,680 mg/L.

Isolat *Azotobacter* A1a dan A9 memiliki kemampuan optimal *bioremoval* pada konsentrasi perlakuan *PbCl₂* 77,91 mg/L, sedangkan isolat *Azotobacter* A5 mampu meremoval Pb^{2+} optimal pada konsentrasi perlakuan *PbCl₂* 111,85 mg/L.

Azotobacter A1a memiliki kemampuan *bioremoval* paling baik dibandingkan dengan isolat yang lain yaitu sebesar 8,825 mg/L, sedangkan A5 adalah yang paling rendah. Hasil *bioremoval* isolat A1a, A5, dan A9 dapat dinyatakan baik karena mampu meremoval diatas baku mutu logam timbal yang diperbolehkan dilingkungan.

Tabel 4.4. *Bioremoval* dan Efisiensi *Bioremoval* *PbCl₂*

Isolat <i>Azotobacter</i>	Kons. Awal (mg/L)	Kons. Akhir (mg/L)	Kons, <i>bioremoval</i> (mg/L)	Persentase <i>Bioremoval</i> (%)
A1a	36,84	33,108	3,733	10,133
A5	36,84	36,505	0,335	0,9
A9	36,84	39,728	-2,888	-7,839
A1a	77,91	69,085	8,825	11,327
A5	77,91	77,740	0,170	0,218
A9	77,91	71,293	6,618	8,494
A1a	111,85	103,875	7,975	7,130
A5	111,85	109,475	2,375	2,123
A9	111,85	111,170	0,680	0,608

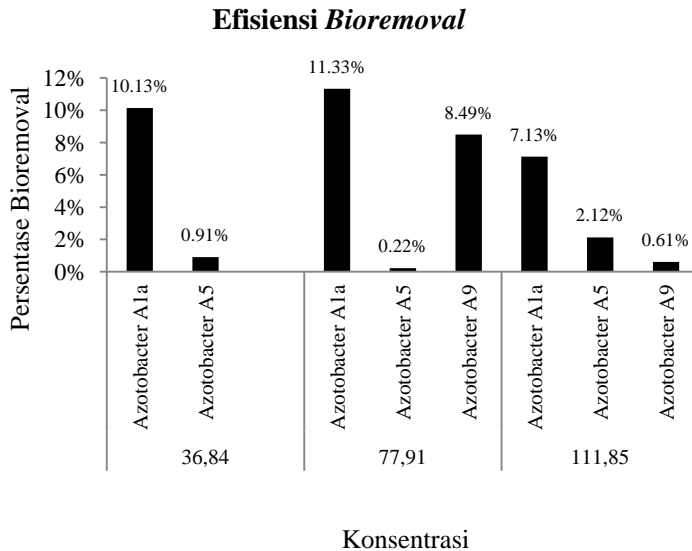
* Analisis *bioremoval* Pb dilakukan di Balai Riset dan Standarisasi Industri Surabaya yang bersertifikasi KAN (Komite Akreditasi Nasional) LP-213-1DN.

** Baku mutu Pb di Lingkungan 0,03 mg/L (PP RI No. 82 Thn. 2001).

Azotobacter A1a memiliki efisiensi *bioremoval* lebih baik dibandingkan isolat yang lain, hal ini sesuai dengan uji resistensi bahwa isolat *Azotobacter* A1a tumbuh lebih baik dibandingkan dengan isolat yang lain. Untuk mempermudah interpretasi hasil

persentase dengan efisiensi *bioremoval*, data disajikan dalam bentuk diagram batang (Gambar 4.6).

Kemampuan *Azotobacter* A5 *meremoval* lebih rendah dibandingkan dengan isolat *Azotobacter* A1a dan A9 dan hasil tersebut berkebalikan dengan uji viabilitas *Azotobacter* A5 yang viabilitasnya lebih baik dari isolat yang lain. Isolat A1a dan A9 dari konsentrasi awal 77,91 mg/L secara berturut-turut mampu *meremoval* sebesar 11,327% dan 8,494% . Pada konsentrasi 150 mg/L A1a menunjukkan kemampuan *bioremoval* yang baik dibandingkan isolat lainnya yaitu sebesar 7,130%. Sehingga dapat diketahui bahwa isolat A1a lebih efektif dalam *meremoval* logam timbal dibandingkan isolat A5 dan A9.



Gambar 4.6. Efisiensi *Bioremoval* *Azotobacter* terhadap $PbCl_2$

Ketiga histogram pada Gambar 4.6 menunjukkan, semakin tinggi konsentrasi $PbCl_2$ yang digunakan dalam perlakuan maka efisiensi *bioremoval* isolat semakin menurun. Hal ini dikarenakan jumlah Pb^{2+} yang diakumulasi oleh sel semakin banyak, serta ion

timbal dapat mempengaruhi kinerja biokimia sel dalam menghasilkan EPS yang merupakan salah satu mekanisme resistensi *Azotobacter* terhadap logam berat. Logam berat, termasuk Pb, dapat mempengaruhi daya ikat spesifik enzim, mengurangi fungsi seluler dan struktur DNA, namun *Azotobacter* mampu mengembangkan sistem resistensi terhadap logam berat melalui eksopolisakarida yang dapat mengkelat logam (Vatamaniuk *et al.*, 2000). Menurut Roane & Pepper (2000), logam dapat merusak membran sel, mempengaruhi daya ikat spesifik enzim, mengurangi fungsi seluler dan struktur DNA, sehingga pemaparan logam timbal yang tinggi dapat mengakibatkan kematian sel bakteri.

Persentase *bioremoval* masing-masing isolat yang telah didapat selanjutnya dilakukan analisis statistik (*Balanced MANOVA*) untuk mengetahui apakah jenis isolat dan konsentrasi yang digunakan berpengaruh terhadap hasil *bioremoval* PbCl₂. Hasil analisis MANOVA jenis isolat tidak berpengaruh terhadap efisiensi *bioremoval*. Konsentrasi yang digunakan juga tidak memiliki pengaruh terhadap efisiensi *bioremoval*. Berdasarkan Tabel 4.4 dan Gambar 4.5 isolat *Azotobacter* A1a dan A9 relatif mampu *meremoval* Pb dibanding isolat *Azotobacter* A5.

Mekanisme resistensi *Azotobacter* terhadap logam timbal secara ekstraselular diperankan oleh Eksopolisakarida. Eksopolisakarida (EPS) memiliki sifat mengikat polutan logam (Janecka *et al.*, 2002). EPS larut di dalam air, diikat lemah oleh matriks tanah, dan setelah mengadsorpsi logam tidak mudah dimineralisasi sehingga berpotensi *meremoval* logam di dalam tanah. Alginat, merupakan jenis EPS yang dihasilkan *Azotobacter*. Alginat dari *Azotobacter* mampu *meremoval* logam toksik seperti Cd²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺ (Rasoluv *et al.*, 2013). Alginat memiliki sifat hidrofilik, tidak bersifat toksik, memiliki afinitas yang tinggi dan mampu mengikat ion logam. Struktur alginat yang mengandung gugus karboksil dan amina sehingga alginat mampu mengabsorpsi logam (Auhim, 2014).

Azotobacter merupakan salah satu bakteri yang dilaporkan mampu beradaptasi dengan kondisi lingkungan tercemar logam berat, salah satunya adalah timbal. Menurut Chen *et al.*, 2005, mekanisme resistensi berhubungan dengan gen yang terletak di kromosom, plasmid atau transposon yang mengatur mekanisme resistensi. Gen yang mengatur resistensi terhadap logam timbal adalah gen *pbr* operon yang terdiri dari *pbr* A,B,C, dan D. *pbrA* menyandi protein yang tergolong tipe ATPase yang mentranspot logam Pb^{2+} , Zn^{2+} dan Cd^{2+} . *pbrB* berperan melengkapi *pbrA*, karena *pbrA* tidak hanya mentransport spesifik ligan Pb^{2+} saja, *pbrB* juga akan memproduksi senyawa fosfor anorganik yang dapat berinteraksi dan mempresipitasi ion logam divalen Pb^{2+} yang berada pada *pbrA*, sehingga akan terbentuk timbal fosfat $Pb_3(PO_4)_2$ yang memiliki kelarutan rendah didalam air sehingga mencegah ion bebas Pb^{2+} masuk kembali pada sitoplasma yang dapat meracuni sel bakteri. Sebaliknya *pbrB* tidak mempengaruhi transpot Zn dan Cd. *PbrC* bersama dengan *pbrB* mentraslasikan protein gabungan untuk membentuk peptidase. Peptidase akan berperan mempengaruhi lipoprotein yang berinteraksi dengan membran plasma, peptidase tidak hanya dihasilkan oleh *pbrC* tetapi juga gen lain yang menyandi produksi peptidase.

4.6 Viabilitas *Azotobacter* Setelah Terpapar $PbCl_2$

Uji viabilitas digunakan untuk mengetahui kemampuan hidup *Azotobacter* setelah terpapar logam $PbCl_2$ selama 24 jam inkubasi.

Karakteristik morfologi koloni isolat *Azotobacter* A1a, A5 dan A9 memiliki ukuran koloni sangat kecil dan menyebar pada seluruh bagian medium. Ketiga isolat *Azotobacter* uji memiliki viabilitas yang sangat tinggi berdasarkan hasil CFU (Tabel 4.5) jumlah koloni >300 koloni atau TNTC (*too numerous to count*). Hasil ini sesuai dengan uji resistensi dan uji viabilitas pada medium NB- $PbCl_2$ yang menunjukkan bahwa isolat *Azotobacter* memiliki resistensi yang baik terhadap logam timbal.

Tabel 4.5. Viabilitas *Azotobacter* Uji setelah Terpapar PbCl₂

Isolat	CFU		
	36,84 mg/L	77,91 mg/L	111,85 mg/L
A1a	>300	>300	>300
A5	>300	>300	>300
A9	>300	>300	>300

Menurut Sobariah (2007) Viabilitas merupakan tingkat ketahanan dan kemampuan hidup dari suatu organisme pada lingkungan yang baru. Sel yang viabel dapat diamati dengan menghitung jumlah sel dari koloni yang terbentuk pada medium cawan agar. Asumsi penggunaan prosedur perhitungan sel viabel adalah setiap sel viabel dapat tumbuh dan membentuk koloni, maka jumlah koloni dan jumlah sel selalu proporsional (Madigan *et al.*, 2009).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang telah diperoleh, dapat disimpulkan bahwa:

1. Isolat *Azotobacter* koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi ITS dengan kode A1a, A1b, A2, A3, A5, A8, A9 dan A10 resisten terhadap PbCl_2 .
2. Isolat *Azotobacter* yang mempunyai kemampuan *bioremoval* tertinggi terdapat pada paparan 77,91 mg/L PbCl_2 , yaitu pada isolat *Azotobacter* A1a dengan efisiensi *bioremoval* 11,37%.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperlukan penelitian lanjutan yang memakai aplikasi isolat *Azotobacter* pada skala lapangan yang terkontrol lingkungannya.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang telah diperoleh, dapat disimpulkan bahwa:

1. Isolat *Azotobacter* koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi ITS dengan kode A1a, A1b, A2, A3, A5, A8, A9 dan A10 resisten terhadap PbCl_2 .
2. Isolat *Azotobacter* yang mempunyai kemampuan *bioremoval* tertinggi terdapat pada pemaparan 77,91 mg/L PbCl_2 , yaitu pada isolat *Azotobacter* A1a dengan efisiensi *bioremoval* 11,37%.

DAFTAR PUSTAKA

Anonim. 2012. [http://file.upi.edu/Direktori/FMIPA/Jur._Pend._Biologi_/19680501994031_Kuliah_Pertumbuhan Miktoba.pdf](http://file.upi.edu/Direktori/FMIPA/Jur._Pend._Biologi_/19680501994031_Kuliah_Pertumbuhan_Miktoba.pdf) [11 Juni 2015].

Arindah, T., Y. Trihadiningrum, M. Shovitri, S.A. Wilujeng & E.S. Pandebesie. 2013. *Bioremoval Kromium Oleh Konsorsium Bakteri Pada Limbah Sintetik Industri Elektroplating. Prosiding Seminar Nasional Manajemen Teknologi XVIII Program Studi MMT-ITS*, ISBN : 978-602-97491-7-5.

Arrizal, S., Rachmadiarti, F., dan Yuliani. 2013. Identifikasi Rhizobakteri pada Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) yang Terpapar Logam Berat Timbal (Pb). **Lentera Bio** Vol. 2 No. 1 Januari 2013: 165–169.

Auhim, H. S. 2014. Adsorption of Lead (II) Ions from Aqueous Solutions by Bacterial Alginate. **1109 J. Chem. Bio. Phy. Sci. Sec.B**. Vol.4, No.2; 1108-1114.

Auhim, H.S. & N. H. Odaa. 2013. Optimization of flocculation conditions of exopolysaccharide bioflocculant from *Azotobacter chroococcum* and its potential for river water treatment. **J. Microbiol. Biotech. Res. 3 (3)**:93-99 ISSN : 2231 –3168 CODEN (USA) : JMBRB4.

Badawi, H. Mona & M. Fayez. 2014. *Azotobacter-cereal panorama: Biodiversity and impacts on plant development and soil nitrogen income in gnotobiotic model system. Middle East Journal of Agriculture Research, 3(2)*: 144-154.

Chen, P., Greenberg, B., Taghavi, S., Romano, C., Lelie, D.Vd., dan He, C. 2005. An Exceptionally Selective Lead(ii)-Regulatory

Protein from *Ralstonia Metallidurans* :Development of a Fluorescent Lead(ii) Probe. **Angew. Chem. Int. Ed.** 44 ,2–6.

Choudhury, R & S. Srivastava .2001. Zinc resistance mechanisms in bacteria. **CURRENT SCIENCE**, vol. 81.

Cooper, S. 2003. **Bacterial Growth and Division: Biochemistry and Regulation of Prokaryotic and Eukaryotic Division Cycles**. Academi Press: San Diego.

DHOCNY (Department of Health Otsego County, New York). 2007. **Lead Poisoning Prevention: What is Lead?**. Department of Health Otsego County. New York.

Effendi, H. 2003. **Telaah kualitas Air, bagi pengelolaan Sumber Daya dan Lingkungan Perairan**. Penerbit Kanisiun (Anggota IKAPI). 024902.

Ekundayo, E.O., dan Killham, K. 2001. Lead Solubilization and Accumulation by Two Strain of *Pseudomonas* Obtained and *B. Bacterium* of Metals Found Around Mining Areas: Evaluation of the Effect of Physical and Physiological Parameters. 19th – 23rd October, **Proceedings** ISBN: 978-0-9802623-5-3 Pretoria, South Africa.

Emtiazi, G., Ethemadifar, Z. & Habibi, M.H. 2004. Production of extracellular polymer in *Azotobacter* and biosorption of metal by exopolymer. Afr. **J. Biotech.** 3:330-333.

Fardiaz, S. 1992. **Polusi Air dan Udara**. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.

Gadd, G.M. 1993. Interaction of Fungi with toxic metals. **New Phytologist** 125:837-843.

Ghosh, S., Sadhukhan, P.C., Ghosh, D.K., Chaudhuri, J., and Mandal, A. 1997. Elimination of Mercury and Organomercurials by Nitrogen-fixing Bacteria. **Bulletin Environmental Contamination Toxicology**, 58: 993-998.

Gupta, A.K., Rathore, P., Kaur, N. and R. Singh. 1990. Production Therma Stability and Immobilization of Inulinase of *Fusarium oxysporum*. J. **Chem. Tech. Biotech.** P: 245-251.

Harley, J.P. and L.M. Prescott. 2002. **Laboratory Exercises in Microbiology**. 5th Ed The McGraw-Hill Companies: USA.

Hidayah, N & M. Shovitri. 2012. Adaptasi Isolat Bakteri Aerob Penghasil Gas Hidrogen pada Medium Limbah Organik. **JURNAL SAINS DAN SENI ITS Vol. 1**, ISSN: 2301-928X.

Hiza, J., dan Apak, R., Colloid, J. **Interface Sciences**. 2006,295, 1-13.

Hogg, S. 2005. **Essential Microbiology**. Jhon Wiley & Sons LTD: England.

Holt, *et al.* 1994. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** 9th Edition. USA: Williams and Wilkins Baltimore.

Janecka, J., Jenkins, M.B., Brackett, N.S., Lion, L.W. & Ghiorse, W.C. 2002. Characterization of a *Sinorhizobium* isolate and its extracellular polymer implicated in pollutant transport in soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 423-426

Khotimah, K., dan dan Zulaika, E. 2013. *Azotobacter* Sebagai Bioakumulator Merkuri. **JURNAL SAINS POMITS Vol. 2**, No. 1, (2013) ISSN: 2337-3539 (2301-9271).

Komousani, T. A., dan Mouselhy, S. S. 2011. Modulation of lead biohazards using a combination of epicatechin and lycopene in rats. **Human and Experimental Toxicology**. 30 (10) 1674-1681.

Li, C. & H.H.P. Fang. 2007. Fermentative Hydrogen Production from Waste Water and Solid Wastes by Mixed Cultures. **Cr it Rev Environ SciTechn vol;37 No.1** :31-39.

Luqman, A., Shovitri, M., dan Zulaika, E. 2012. Resistensi Bakteri *Azotobacter* Terhadap Logam Berat. **Scientific Conference of Enveronmental Technology IX**.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., dan Clark, D.P. 2009. **Brock Biology of Microorganism 13th Edition**. Benjamin Cummings. Sansome Street, San Francisco.

Matthew, D.R., C.J. Rice., .Lucchini., C. Pin., A. Thompson., A.D.S. Cameron., M. Alston. 2011. Lag Phase is a Distinct Growth Phase that Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. **Journal of Bacteriology**, 686-701.

Murthy, S., Geetha, B., dan Sarangi, S.K. 2011. Effect of Lead on Metallothionen Concentration in Leadresistant Bacteria *Bacillus cereus* Isolation from Industrial Effluent. Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB>. **African Journal of Bacteriology**, 10[71]:15966-15972.

Muslihah, S., W. Harimurti. 2011. **Pengaruh pH dan Konsentrasi Zymomonas mobilis untuk Produksi Etanol dari Sampah Buah Jeruk**. Skripsi Jurusan Teknik Lingkungan FTSP-ITS.

Nakamura, L. 2000. Phylogeny of *Bacillus sphaericeus*- like organism. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 50: 1715-1722.

NHMRC (National Health & Medical Research Council). 2009. **NHMRC Public Statement, August 2009 – Blood lead levels: Lead exposure and health effects in Australia**. National Health & Medical Research Council , 7th August 2009.

Notodarmojo, S. 2005. **Pencemaran Tanah dan Air Tanah**. Penerbit ITB. ISBN 979-3507-43-8.

Olenara, M.S., S. Tunalib. A.S. Ozcanc., O. Adnan., dan T. Gedikbeyb. 2008. Adsorption Characteristics of Lead (li) Ions Onto The Clay/Poly (Methoxyethyl) Acrylamide (Pmea) Composite from Aqueous Solution Presented at The Conference on Desalination and The Environment. Sani Resort, Halkidiki, Greece. April 22-25, 2007. **Desalination**, 223: 308-322.

Prasetya, Y.A., Kuswytasari, N.D., dan Zulaika, E. 2012. Aadaptasi Genera *Bacillus* pada Media yang Mengandung Logam Timbal. **Environmental Technology Scientific Conference IX-2012**. Advances in Agriculture and Municipal Waste Technology to Anticipate Food and Energy Crisis. ISBN 978-602-95595-5-2.

R. Saraswati, E. Husen, dan R.D.M. Simanungkalit. 2007. **Metode Analisis Biologi Tanah**. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumber Daya Lahan Pertanian : Jawa Barat.

Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S & Deshpande, V.V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**.

Rasulov, B.A., Yili, A., dan Aisa, H.A. 2013. Biosorption of Metal Ions by Exopolysaccharide Produced by *Azotobacter chroococcum* XU1. **Journal of Environmental Protection**, 2013, 4, 989-993.

Roane, T.M., L.L. Pepper. 2000. Microorganism and Metal Pollution. **Environmental Microbiology**, 404-422.

Ruhnayat, A. 2007. Effect of *Azotobacter*, bat guano danglyricidia compost on the growth of bushy black pepper (*Piper nigrum* L.). **Pros. Sem. XIII Persada. Fak. Kedokteran Hewan IPB**. 249-252.

Ruizbang, L., Qinqin, S., Lizhi, J., Shuling, S., dan Zhenaheng, G. 1990. Use Of *Azotobacter* sp. An an Indicator to Detect The Toxicity of Heavy Metals in Soils. **Journal of Environmental Sciences (China)**, Vol. 2 (3), Page 123-128.

Sabra, A., P. Zeng, H. Lonsdorf, and W.D. Deckwer. 2000. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in producing nitrogenase. **Appl. Environ. Microbiol** 66:4037-4044.

Sakkir, B., Khidri, M.A., dan Sjafruddin A. 2008. Kadar timbal dalam darah pada anak-anak dikotaMakasar. **Jurnal Kesehatan Masyarakat Madani**. 01(02).

Satya, A., dan Larashati, S. 2012. Kemampuan Isolat Bakteri Dari Sedimen Situ Sebagai Aquatic Bioremoval Agent Ion Logam Timbal (Pb). **Prosiding Seminar Nasional Limnologi VI Tahun 2012**.

Sharma, T. 2013. Heavy Metal Tolerance of Gram Positive Bacteria Isolated from Contaminated Soil of Pithampur.

International Journal of Pharmaceutical & Research Sciences (IJPRS), 2:432-436.

Smith, W. H. 2012. Lead Contamination of the Roadside Ecosystem. **Journal of the Air Pollution Control Association**. Volume 26, No. 8.

Sobariah, E. .2007. **Viabilitas Bakteri Probiotik In Vitro dan Pengaruh Pemberian Air Beroksigen terhadap Viabilitas Bakteri Probiotik secara In Viv**. Tesis Pasca Sarjana IPB-Bogor.

Suhendrayatna. 2011. **Bioremoval logam berat dengan menggunakan mikroorganisme**. (suatu kajian pustaka). Disampaikan pada seminar on air bioteknologi untuk Indonesia. 1-14 Februari.

Syamsudin, A.N., Tedja, I., dan Achmad, S.S. 2005. Bioakumulasi Logam Berat oleh beberapa Galur. **Hayati**, 12[13]: 08-111.

Turpeinen, R., 2002. **Interaction Between Metals, Microbes and Plants –Bioremediation of Arsenic and Lead Contaminated Soils**. Departement of Ecological and Environmental Sciences, University of Helsinki. Academi dissertation in environmental ecology, Faculty of Science of the University of Helsinki, Neopoli, Lathi, on May 17th.

Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y.P., dan Rea, P.A. 2000. Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelin synthase. **J. Biol. Chem**. 275: 31451-31459.

Wang, L., Zengyong W., dan Jianzhu, L. 2010. Protective effect of N-acetilcysteine on experimental chronic lead

nephropotoxicity in immature female rats. **Human and Experimental Toxicology**. 29(7) :581-591.

Wardhayani, S. 2006. **Analisis Risiko Pencemaran Bahan Toksik Timbal (Pb) Pada Sapi Potong Di Tempat Pembuangan Akhir (Tpa) Sampah Jatibarang Semarang**. Tesis Untuk memenuhi sebagian persyaratan Mencapai derajat Sarjana S-2 Magister Kesehatan Lingkungan.

Wulandari, S.N., Dewi, N.S., dan Suwondo. 2005. Identifikasi Bakteri Pengikat Timbal (Pb) Pada Sedimen Di Sungai Siak. **Jurnal Biogenesis**, 1 [2]: 62-65.

Zulaika, E., Luqman, A., Arindah, T., dan Sholikhah, U. 2012. **Bakteri Resisten Logam Berat yang Berpotensi sebagai Biosorben dan Bioakumulator**. Seminar Nasional Waste Management for Sustainable Urban Development. Teknik Lingkungan, FTSP-ITS, 21 Pebruari 2012.

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1: Komposisi Medium NA	49
Lampiran 2: Komposisi <i>Burk</i> Medium	49
Lampiran 3: Komposisi Medium NB	49
Lampiran 4: Skema uji viabilitas <i>Azotobacter</i> pada medium NB-PbCl ₂	50
Lampiran 5: Skema kerja <i>bioremoval</i> isolat <i>Azotobacter</i>	51
Lampiran 6: Bentuk Koloni	51
Lampiran 7: Uji Motilitas	52
Lampiran 8: Uji Katalase	53
Lampiran 9: Pewarnaan Gram	54
Lampiran 10: Pewarnaan <i>Methylene blue</i>	55
Lampiran 11: Pewarnaan <i>Cyst</i>	57
Lampiran 12: Data OD Kurva Pertumbuhan Isolat A1a, A5, dan A9	58
Lampiran 13: Hasil Analisis <i>Bioremoval</i>	60
Lampiran 14: Uji Viabilitas Isolat Setelah Terpapar Logam PbCl ₂ Selama	

	24 Jam	61
Lampiran 15:	Analisis Data Dengan Menggunakan Balanced Anova	62

LAMPIRAN

Lampiran 1: Komposisi Medium NA

A. Komposisi Medium NA (Nutrient Agar)/ 1L

- *Beef extract* (3 gr)
- Pepton (5 gr)
- Agar (12 gr)

Cara membuat: 20 gr NA dilarutkan dalam 1 L akuades, dihomogenkan dengan hot plate stirrer, dan disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

*Untuk pembuatan NA-PbCl₂, ditambahkan PbCl₂ sesuai konsentrasi yang dibutuhkan, misal: NA- PbCl₂ 1mg/L, berarti PbCl₂ ditambahkan sebanyak 1 mg untuk 1 L NA.

Lampiran 2: Komposisi *Burk* Medium

- | | |
|---|---|
| - KH ₂ PO 0.2 g/L | - Sucrose 20.0 g/L |
| - K ₂ HPO ₄ 0.8 g/L | - Agar 15.0 g/L |
| - MgS ₄ 0.2 g/L | - pH 7.2 (0.25 mg/mL |
| - CaCl 2 0.09 g/L | Na ₂ MoO ₄ , 5.0 mg/nil |
| - Na ₂ MoO ₄ 1.0 ml | FeSO ₄). |
| - FeSO ₄ 1.0 ml | |

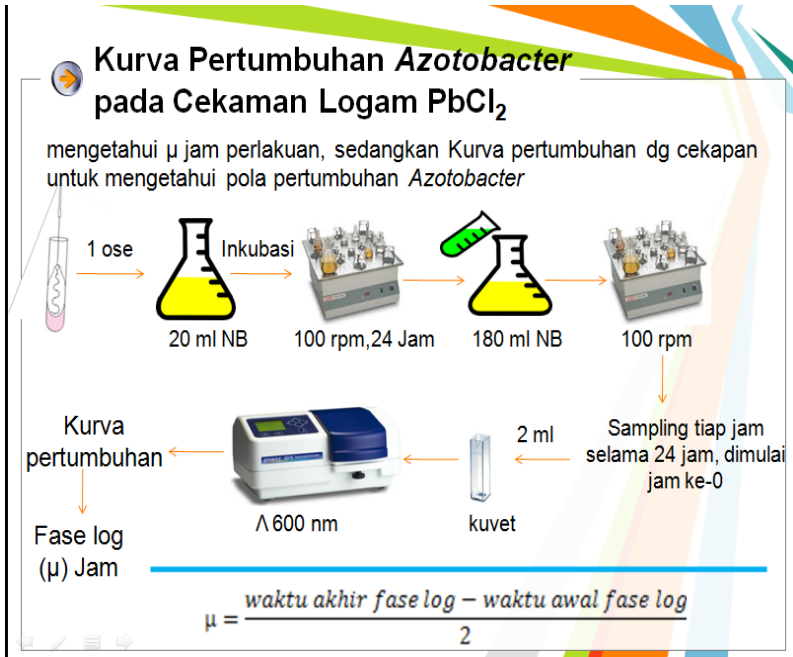
Lampiran 3: Komposisi Medium NB

B. Komposisi Medium NB (Nutrient Broth)/ 1L

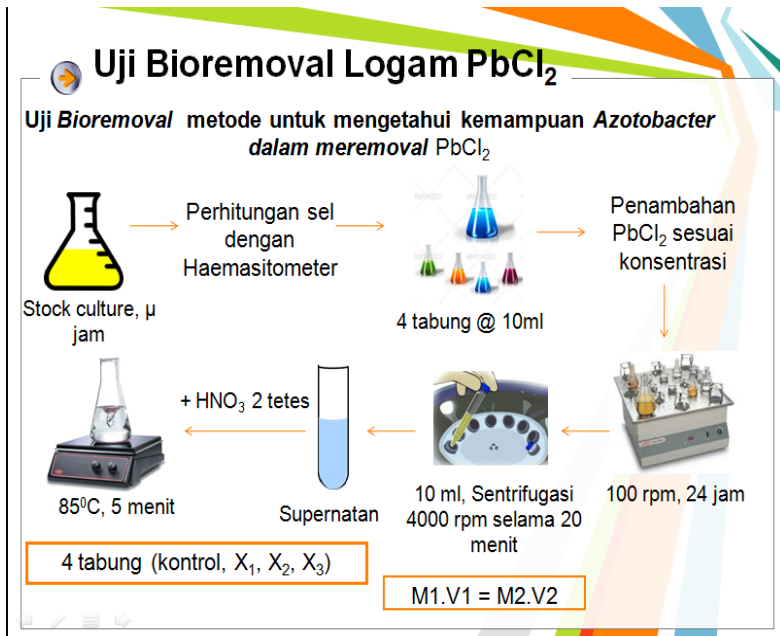
- Lab Lemco Powder (1 gr)
- *Yeast extract* (2 gr)
- Pepton (5 gr)
- Sodium chloride (5 gr)

Cara membuat: 13 gr NB dilarutkan dalam 1 L akuades, dihomogenkan dengan hot plate stirrer, dan disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

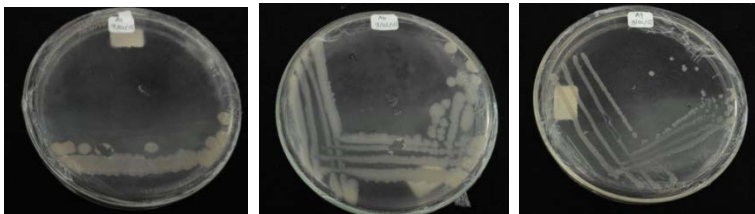
Lampiran 4: Skema uji viabilitas *Azotobacter* pada medium NB-PbCl₂

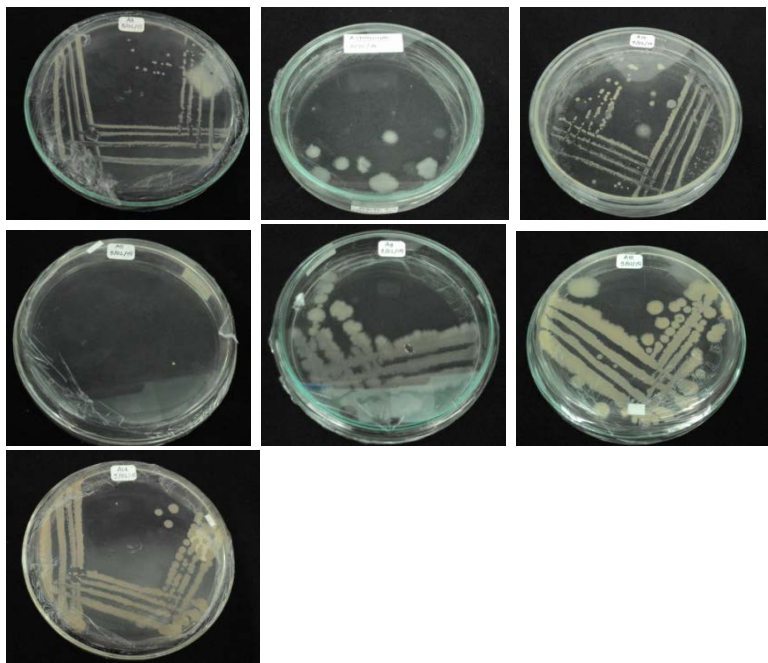


Lampiran 5: Skema kerja *bioremoval* isolat *Azotobacter*

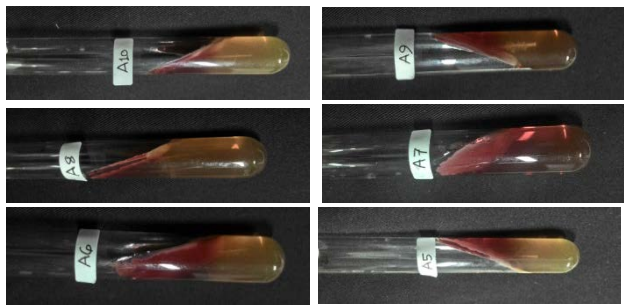


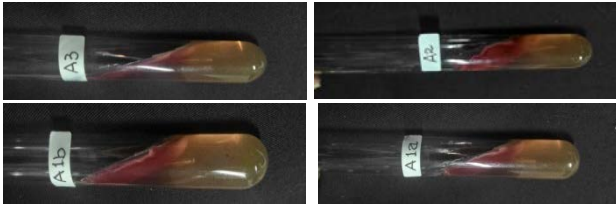
Lampiran 6: Bentuk Koloni





Lampiran 7: Uji Motilitas



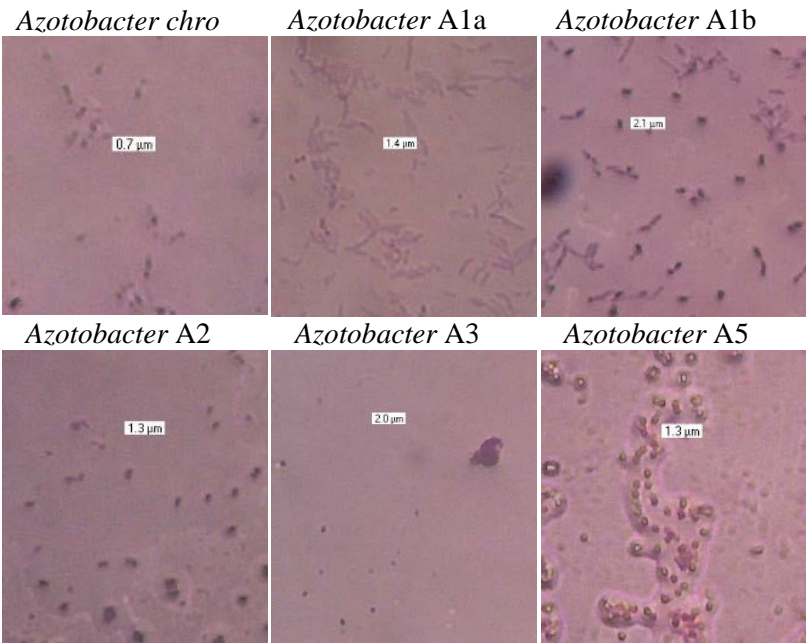


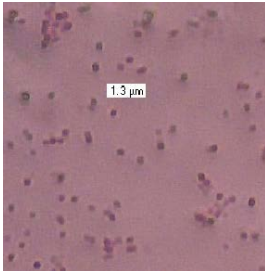
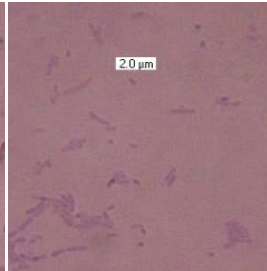
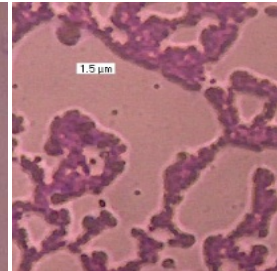
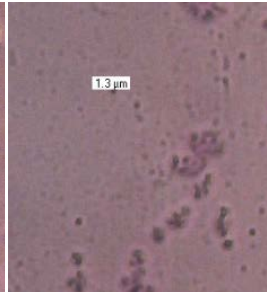
Lampiran 8: Uji Katalase



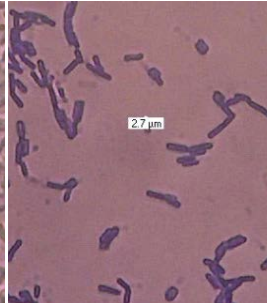
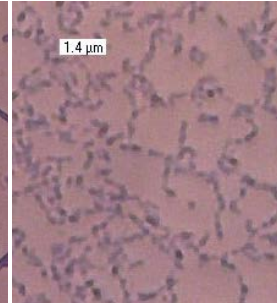


Lampiran 9: Pewarnaan Gram

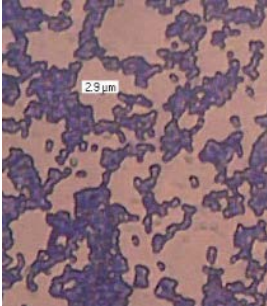


Azotobacter A6*Azotobacter* A7*Azotobacter* A8*Azotobacter* A9*Azotobacter* A10

Lampiran 10: Pewarnaan *Methylene Blue*

Azotobacter chro*Azotobacter* A1a*Azotobacter* A1b

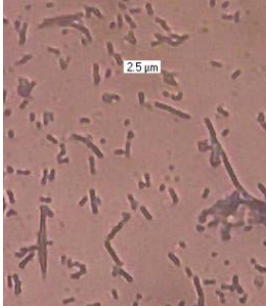
Azotobacter A2



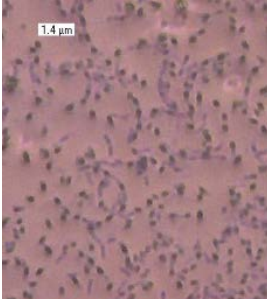
Azotobacter A3



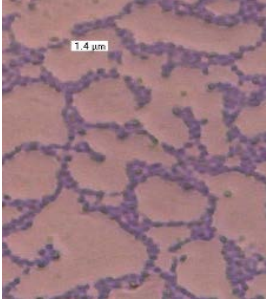
Azotobacter A5



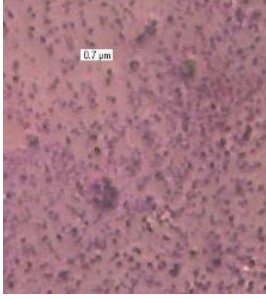
Azotobacter A6



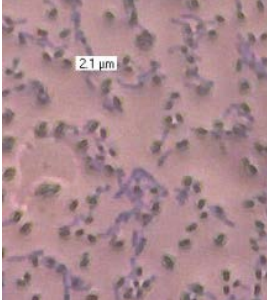
Azotobacter A7



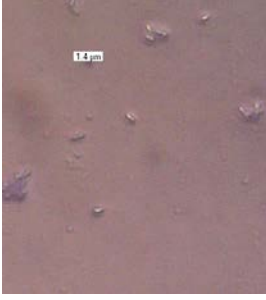
Azotobacter A8



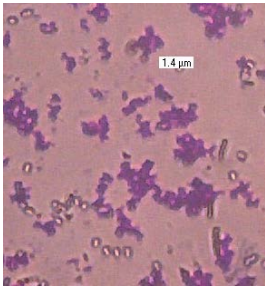
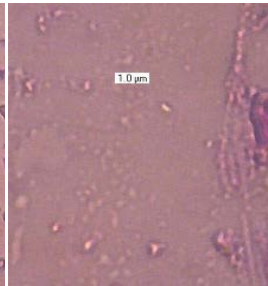
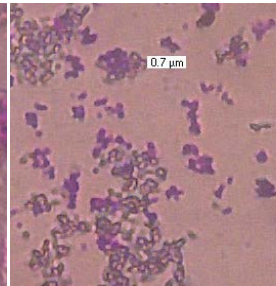
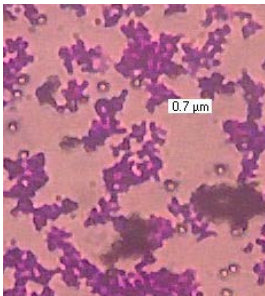
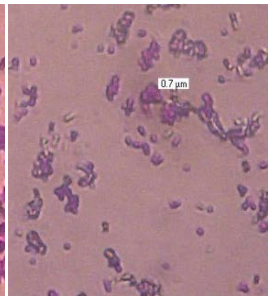
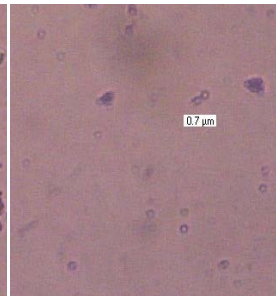
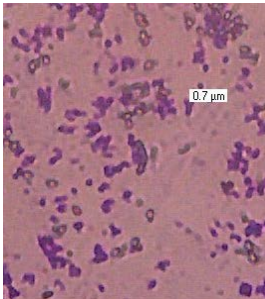
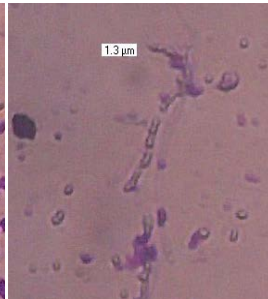
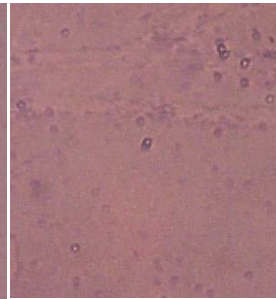
Azotobacter A9

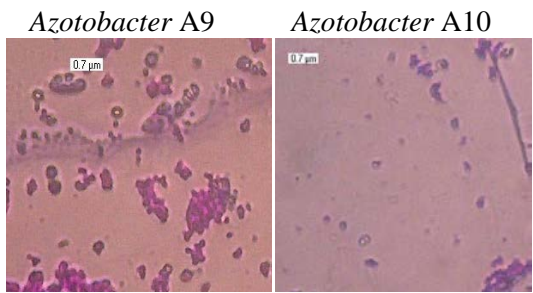


Azotobacter A10



Lampiran 11: Pewarnaan Cyst

Azotobacter chro*Azotobacter A1a**Azotobacter A1b**Azotobacter A2**Azotobacter A3**Azotobacter A5**Azotobacter A6**Azotobacter A7**Azotobacter A8*



Lampiran 12: Data OD Kurva Pertumbuhan Isolat A1a, A5, dan A9


Jam ke-	A1a			
	0 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	150 mg/L
0	0,559	0,088	0,098	0,095
2	0,8725	0,094	0,138	0,233
4	0,972	0,146	0,232	0,279
6	0,987	0,267	0,138	0,241
8	1,06	0,266	0,283	0,278
10	1,102	0,308	0,327	0,324
12	1,185	0,339	0,402	0,319
14	1,2365	0,368	0,368	0,347
16	1,244	0,338	0,38	0,372
18	1,1855	0,392	0,451	0,434
20	0,9335	0,423	0,431	0,409
22	0,966	0,394	0,41	0,4
24	0,796	0,391	0,435	0,397

Jam ke-	A5			
	0 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	150 mg/L
0	0,4655	0,007	0,096	0,02
2	0,852	0,02	0,182	0,049
4	1,08	0,018	0,32	0,082
6	1,224	0,035	0,298	0,128
8	1,2755	0,053	0,316	0,211
10	1,4415	0,093	0,429	0,214
12	1,495	0,167	0,532	0,299
14	1,363	0,171	0,368	0,345
16	1,244	0,208	0,641	0,57
18	1,223	0,49	0,695	0,635
20	0,909	0,468	0,768	0,74
22	1,003	0,461	0,728	0,704
24	0,847	0,559	0,701	0,717

Jam ke-	A9			
	0 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	150 mg/L
0	0,3695	0,07	0,098	0,111
2	0,98	0,11	0,133	0,135
4	1,169	0,184	0,272	0,122
6	1,3465	0,214	0,248	0,13
8	1,4005	0,335	0,353	0,356
10	1,444	0,354	0,325	0,353
12	1,476	0,359	0,394	0,33
14	1,4465	0,353	0,411	0,379
16	1,4085	0,396	0,43	0,402

18	1,3545	0,428	0,415	0,403
20	1,456	0,438	0,409	0,465
22	1,429	0,422	0,4	0,433
24	1,3785	0,421	0,411	0,461


Lampiran 13: Hasil analisis *bioremoval*



**KEMENTERIAN
PERINDUSTRIAN**
REPUBLIK INDONESIA

BADAN PENGKAJIAN KEBIJAKAN IKLIM DAN MUTU INDUSTRI
BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI SURABAYA
LABORATORIUM PENGUJIAN DAN KALIBRASI
BARISTAND INDUSTRI SURABAYA

Jl. Jagir Wonokromo No. 360 Surabaya (60244), Telp. (031) 8410054, (031) 7000034, Fax. (031) 8410480
<http://surabaya.bpkim.kemperin.go.id/>



KAN
Kantor Akreditasi Nasional
LABORATORIUM PENGUJIAN
LP-313-10N


LAPORAN HASIL UJI
No. 1459/LMU/2015

No. Analisa : P. 1664 a/d P. 1684
 Contoh : Bioremoval Logam Pb
 Merk : -
 Diterima Tanggal : 30 April 2015
 Catatan Sample : 10 ml air dalam wadah tabung plastik

Nama Pengirim : ULIS WAHYU ASTUTIK
 Alamat : Keputh Gg. 3C No. 58 A
 SURABAYA - JAWA TIMUR

No	No Analisa	Kode	Parameter Pb (mg/l)	Metode Uji
1	P.1664	A1a 50 ppm (1)	34.125	SNI 6969.8 : 2009
2	P.1665	A1a 50 ppm (2)	32.09	SNI 6969.8 : 2009
3	P.1666	A1a 100 ppm (1)	70.105	SNI 6969.8 : 2009
4	P.1667	A1a 100 ppm (2)	68.065	SNI 6969.8 : 2009
5	P.1668	A1a 150 ppm (1)	104.045	SNI 6969.8 : 2009
6	P.1669	A1a 150 ppm (2)	103.705	SNI 6969.8 : 2009
7	P.1670	A5 50 ppm (1)	36.505	SNI 6969.8 : 2009
8	P.1671	A5 50 ppm (2)	37.18	SNI 6969.8 : 2009
9	P.1672	A5 100 ppm (1)	75.535	SNI 6969.8 : 2009
10	P.1673	A5 100 ppm (2)	79.945	SNI 6969.8 : 2009
11	P.1674	A5 150 ppm (1)	109.475	SNI 6969.8 : 2009
12	P.1675	A5 150 ppm (2)	120.335	SNI 6969.8 : 2009
13	P.1676	Ag 50 ppm (1)	41.595	SNI 6969.8 : 2009
14	P.1677	Ag 50 ppm (2)	37.86	SNI 6969.8 : 2009
15	P.1678	Ag 100 ppm (1)	70.105	SNI 6969.8 : 2009
16	P.1679	Ag 100 ppm (2)	72.48	SNI 6969.8 : 2009
17	P.1680	Ag 150 ppm (1)	112.53	SNI 6969.8 : 2009
18	P.1681	Ag 150 ppm (2)	111.17	SNI 6969.8 : 2009
19	P.1682	Logam PbCl ₂ 50 ppm	36.84	SNI 6969.8 : 2009
20	P.1683	Logam PbCl ₂ 100 ppm	77.91	SNI 6969.8 : 2009
21	P.1684	Logam PbCl ₂ 150 ppm	111.85	SNI 6969.8 : 2009

Catatan: Parameter uji sesuai dengan permintaan

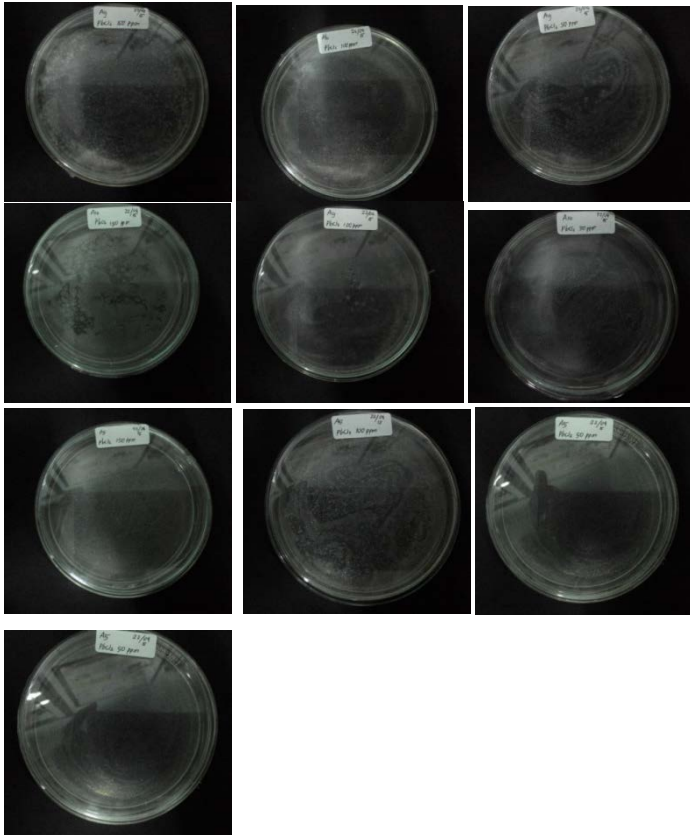


05 Mei 2015
 Kepala Peneliti
 Laboratorium Lingkungan
 Chay W. Mandari, N. ST
 NIP. 196402212006022001

Hal. 2 dari 2 (Page 2 of 2)

Perhatian :
 Laporan Hasil Uji hanya berlaku untuk contoh diatas

Lampiran 14: Uji Viabilitas isolat setelah terpapar logam $PbCl_2$ selama 24 jam



Lampiran 15: Analisis data dengan menggunakan Balanced Anova

ANOVA: C3 versus C1; C2

MANOVA for Isolasi

s = 1 m = 0,0 n = 1,0

Criterion	Statistic	F	DF		P
			Num	Denom	
Wilks'	0,38462	3,200	2	4	0,016
Lawley-Hotelling	1,59994	3,200	2	4	0,016
Pillai's	0,61538	3,200	2	4	0,016
Roy's	1,59994				

MANOVA for Konsentrasi

s = 1 m = 0,0 n = 1,0

Criterion	Statistic	F	DF		P
			Num	Denom	
Wilks'	0,66864	0,991	2	4	0,379
Lawley-Hotelling	0,49556	0,991	2	4	0,379
Pillai's	0,33136	0,991	2	4	0,379
Roy's	0,49556				

RIWAYAT PENULIS



Lilis Wahyu Astutik panggilan Lilis lahir di Jombang 21 Oktober 1992 dari pasangan suami istri Bapak Burhan dan Ibu Nuryani. Penulis adalah anak ketiga dari 4 bersaudara. Penulis sekarang bertempat tinggal di Dsn. Bandung, Ds. Bandung RT/RW 03/02 No. 04, Kec. Diwek, Kab. Jombang. Riwayat pendidikan penulis adalah MI Bandung III, SMP Negeri 1 Diwek,

SMA Negeri 2 Jombang, setelah lulus SMA penulis berkeinginan untuk melanjutkan pendidikan ke jenjang kuliah dan pada tahun 2011 penulis terdaftar sebagai mahasiswa Biologi Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya. Pada saat kuliah penulis aktif dalam kegiatan organisasi dan memiliki beberapa prestasi seperti PKM P Terdanai DIKTI 2013 Juara II Presentasi GK PKM ITS EXPO 2013, Pemakalah Publikasi ilmiah IECC 2014. Penulis yang terdaftar dalam anggota B-16 ini semasa kuliah aktif menjadi asisten dosen praktikum Biokimia dan Fisiologi Hewan. Penulis memiliki minat yang tinggi dalam Bidang Mikrobiologi sehingga penulis mengambil peminatan Mikrobiologi dan Bioteknologi dan bidang tersebut yang mengantarkan penulis memperoleh gelar Sarjana Sains.